

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Gamtos mokslų fakultetas

Biochemijos ir biofizikos katedra

Neurobiologijos studijų programos II k. studentė

Inga Starovoitova

Magistrinis darbas

Išsėtinės sklerozės sukėlimo ir terapijos elektrofiziologinis
įvertinimas

Darbo vadovas:

Doc. A. Alaburda

Konsultantas:

Prof. O. Rukšėnas

Vilnius 2009

Išsėtinės sklerozės sukėlimo ir terapijos elektrofiziologinis įvertinimas

Darbas atliktas Vilniaus universiteto Biochemijos ir biofizikos katedroje

Inga Starovoitova

/parašas/

Darbo vadovai:

Doc. A. Alaburda

/parašas/

Turinys

Ivadas.....	5
1. Literatūros apžvalga	7
1.1 Išsėtinė sklerozė.....	7
1.1.1 Paplitimas	8
1.1.2 IS atsiradimo priežastys.....	10
1.1.3 T reguliacinių ląstelių vaidmuo išsėtinėje sklerozėje	14
1.2 Diagnostika.....	15
1.2.1 Diagnostiniai kriterijai	15
1.2.2. MRT	16
1.2.3 Juosmens punkcija.....	17
1.2.4 Sukeltieji potencialai	18
1.2.5 EDSS	18
1.3 Gydymas	19
1.3.1 Terapija	19
1.3.2 Simptominė terapija.....	20
1.3.3 Kamieninės ląstelės	20
1.4 Gyvūnų modelis Išsėtinei sklerozei tirti	21
1.4.1 EAE	21
1.4.2 EAE rūšys	22
2. Eksperimentas.....	22
2.1 Eksperimento eiga	22
2.2 EMG	22
2.2.1 H reflekso ir M bangos kelias.....	23
2.2.2 H/M santykis	23
2.3 Metodika.....	24
3. Rezultatai	27
3.1 H/M parametrų analizė	27
3.2 Svorio kitimas.....	29
3.3 Mirtingumo įvertinimas.....	34
3.4 Atskirų individų analizė	35
4. Rezultatų aptarimas	37
Išvados.....	39
Literatūros sąrašas	40
Santrauka	43
Summary.....	44
Priedai.....	45

Santrupos

CNS – centrinė nervų sistema

IS – Išsėtinė sklerozė

MRT – magnetinio tomografo tyrimas

MBP – pagrindinis mielino baltymas

MOG – Mielino oligodendrocitų glikoproteinas

PLP – Protolipidinis baltymas

CFA – Pilnas Freudo adjuvantas

VEP – Vizualiai iššauktieji potencialai

EAE – Eksperimentinis autoimuninis encefalomyelitas

EMG – Elektromiograma

Treg – T reguliacinės ląstelės

EDSS – išplėstinė negalios įvertinimo skalė

Įvadas

Šiuo metu žmonija kovoja su daugybe sunkių, mirtinų ligų – ŽIV, AIDS, įvairios Vėžio formos. Tarp šių baisių ligų sutinkame dar vieną – išsėtinė sklerozė. Pirmą kartą ji buvo apibūdinta net prieš 173 metus (1835 Jean-Martin Charcot). Tai sunki, nepagydoma liga. Ilgą laiką mokslininkai kovoja su ja, ieško ne tik vaistų jai pagydyti, bet taip pat bando išsiaiškinti šios ligos priežastis. Per ilgus metus tyrinėjimo niekas taip ir nenustatė tikslios priežasties. Yra tik daugybė teorijų ir hipotezių, kas sukelia šią ligą. Kol kas vienintelis būdas kovojant su šia liga, tai jos palengvinimas, simptomų sumažinimas, skausmo malšinimas.

Išsėtinė sklerozė – paplitusi liga po visą pasaulį. Šiai ligai tirti skiriama daug laiko ir pinigų. Naudojama įvairi įranga ir metodai. Taikoma įvairi terapija ir ieškoma vis naujų. Eksperimentai apsiriboja ties gyvūnais. Ilgą laiką naudojamas EAE gyvūno modelis. Tyrimai vykdomi labai įvairūs – genetiniai, biocheminiai, elektrofiziologiniai ir kt. Nustatymo būdai nuo paprasčiausios apžiūros iki MRT.

UAB „IMUNOLITA“, kuri vykdo mokslinę veiklą bei diegia mokslinių tyrimų rezultatus praktikoje, vykdo projektą „Nauja išsėtinės sklerozės gydymo technologija paremta vakcinacija autologinėmis T-lastelėmis“. Taip pat buvo atlikti nepriklausomi elektrofiziologiniai tyrimai, bandant atrasti naujų būdų stebint IS progresavimą ir ieškant naujų priežasčių. Įvertinimui buvo pasirinkta analizuoti h reflekso ir M bangos santykius bei svorio kitimą. H_{max}/M_{max} santykis jau seniai naudojamas įvertinti įvairius nervų sistemos pažeidimus. Matuojant EMG iš H ir M verčių nedaug ką galima pasakyti. Todėl imamas šių verčių maksimumų – H_{max}/M_{max} - santykis. Kur H_{max} yra maksimali reflekso reikšmė, kuri rodo skirtingų motorinių neuronų maksimalų sužadinimą, M_{max} vaizduoja maksimaliai aktyvuoto raumens atsaką

Darbo tikslas:

Elektrofiziologiniais parametrais ir kūno svorio kitimu apibūdinti išsėtinės sklerozės progresavimą ir gydymą.

Darbo uždaviniai:

1. Matuoti triušių H/M santykį kas savaitę 16 savaitių trukmės eksperimento metu
2. Matuoti triušių svorį kas savaitę 16 savaitių trukmės eksperimento metu

3. Išanalizuoti H/M santykio priklausomybę nuo išsėtinės sklerozės progresavimo ir gydymo
4. Išanalizuoti triušių svorio priklausomybę nuo išsėtinės sklerozės progresavimo ir gydymo

1. Literatūros apžvalga

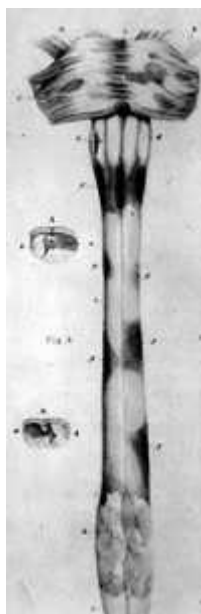
1.1 Išsėtinė sklerozė

Išsėtinė sklerozė (IS) – centrinės nervų sistemos autoimuninė liga, kai imuninė sistema atakuoja centrinę nervų sistemą ir sukelia demielinizaciją – mielino irimą. Šie pažeidimai sulėtina ar visai užblokuoja signalus tarp kūno ir smegenų ir sukelia tam tikrus simptomus, tokius kaip:

- regėjimo sutrikimai;
- raumenų silpnumas;
- problemos su koordinacija ir pusiausvyra;
- mąstymo ir atminties sutrikimai.

Niekas nežino kas iš tikrųjų sukelia IS. Žinoma, kad tai yra uždegiminė liga, kuri daugiau būdinga moterims. Susirgimo amžius svyruoja nuo 20 iki 40 metų. (<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/multiplesclerosis.html>)

Išsėtinė sklerozė – tai liga, kuria domimasi jau labai seniai. To pavyzdys pirma IS iliustracija (1 pav.), nupiešta Robert'o Carswell'o (1791-1857) 1938 metais (T. Jock Murray 2005).

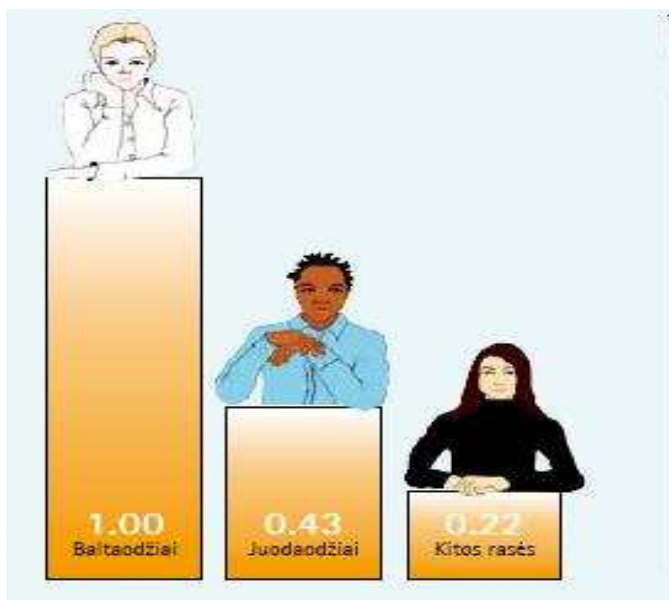


1 pav. Pirmoji IS iliustracija

1.1.1 Paplitimas

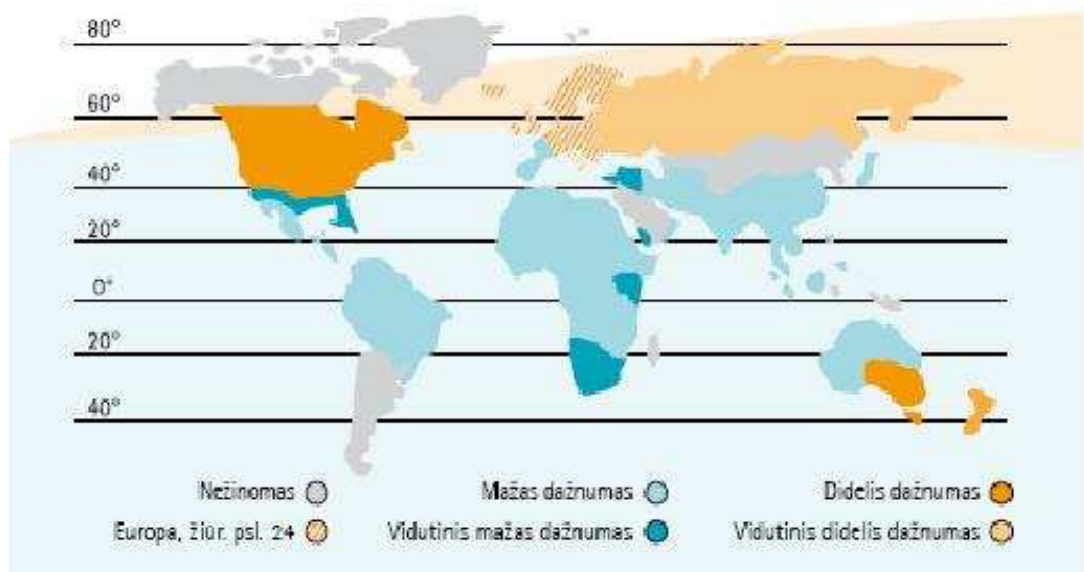
Išsėtinė sklerozė – liga, paplitusi po visą pasaulį. Kol kas ji nėra pagydoma, bet tik sumažinami jos simptomai. Išsėtinės ligos paplitimas priklauso nuo įvairių veiksnių – geografija, amžius, lytis ir net gi rasė.

Yra nustatyta, kad ši liga priklauso ir nuo rasių (2 pav.). Pavyzdžiui, šiaurės Europos gyventojai dažniau serga nei juodieji afrikiečiai. Jungtinėse Amerikos Valstijose Afrikos amerikiečiai serga dažniau nei juodieji žmonės Afrikoje, tačiau rečiau nei vyrai kaukaziečiai JAV. (<http://www.is-centras.lt>).



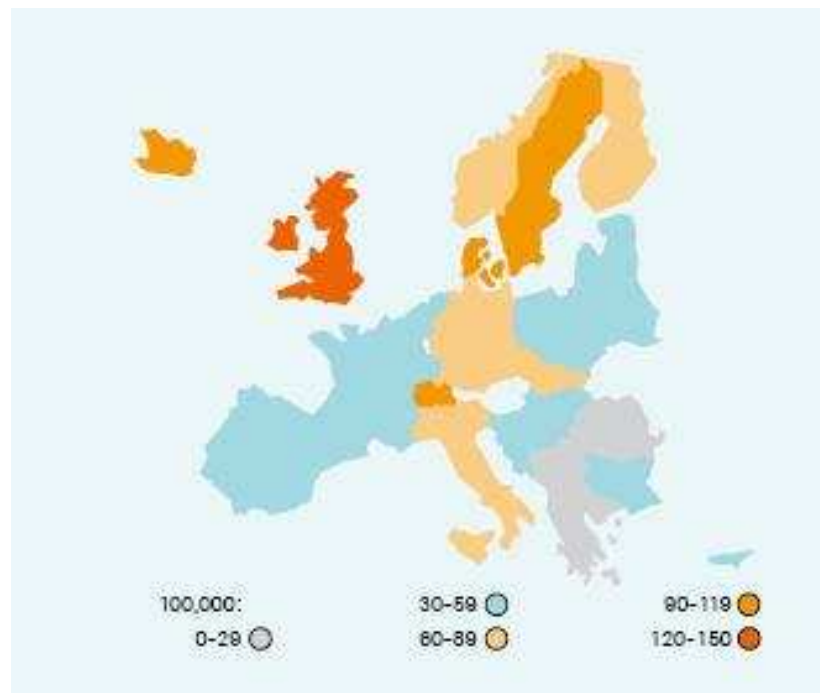
2 pav. IS priklausomybė nuo rasės

Jeigu skirstyti paplitimą pagal kontinentus, tai didžiausią procentą sergančiųjų IS matome JAV (3 pav.). Šiaurės Amerikoje IS serga daugiau nei 400 000 žmonių, Europoje – apie 500 000, iš viso pasaulyje šia liga sergančiųjų yra apie 2,5 mln. IS dažnis skiriasi priklausomai nuo žemės rutulio vietų, tačiau IS dažnesnė yra ekonomiškai išsivysčiusiose vietovėse. Yra aiškūs geografinio skirtumo įrodymai. Dažniausiai (sergančiųjų skaičius populiacijoje) IS serga vidutinio klimato zonų gyventojai, rečiausiai – žmonės, gyvenantys karšto klimato zonose. Daug tyrimų pagrindžia, kad sergančiųjų dažnis didėja tolyn nuo pusiaujo į abu pusrutulius – tiek į šiaurės, tiek į pietų. Pavyzdžiui, Europoje IS dažnis didėja nuo pietų į šiaurę. (<http://www.is-centras.lt>).



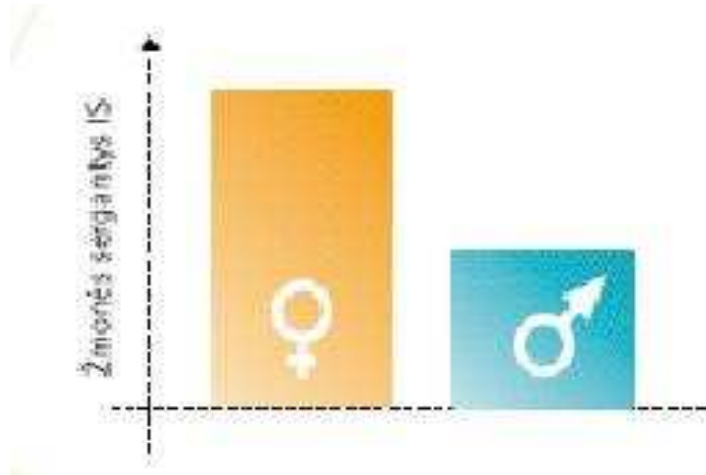
3 pav. IS paplitimas pasaulyje.

IS paprastai pasireiškia tarp 20 ir 40 metų, tačiau liga taip pat gali prasidėti ir jaunesniems, ir vyresniems žmonėms. Visgi ligos pradžios vidurkis yra 30 metų. Nežiūrint IS pasireiškimo dažnio skirtumų, ligos pradžios amžiaus vidurkis visame pasaulyje yra toks pat (4 pav.).



4 pav. IS priklausomybė nuo amžiaus

Dauguma autoimuninių ligų, kaip ir IS, nevienodai pasiskirsto tarp lyčių ir dažniau pasireiškia moterims nei vyrams. IS moterims diagnozuojama dukart dažniau nei vyrams (5 pav.).



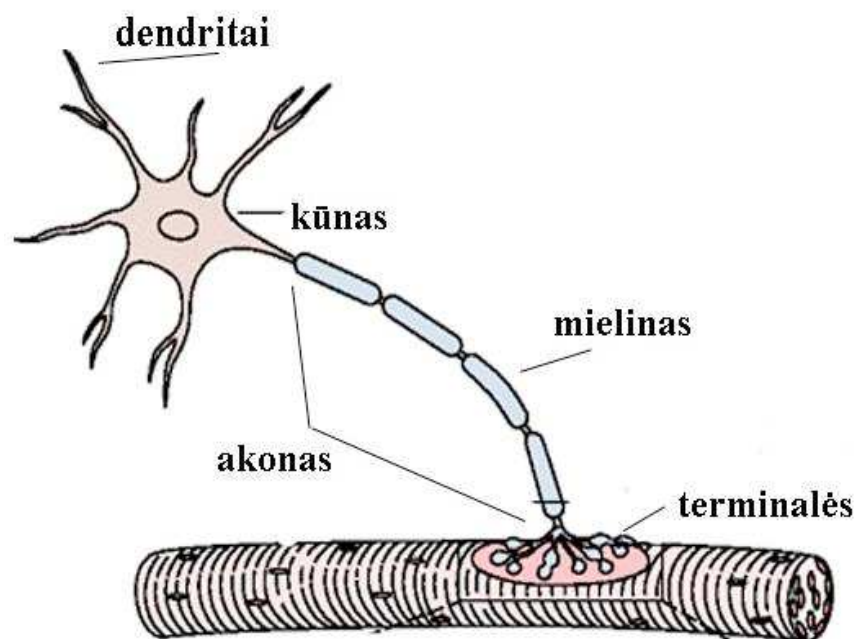
5 pav. IS tarp skirtingų lyčių.

1.1.2 IS atsiradimo priežastys

Viena iš IS atsiradimo priežasčių – demielinizacija. Taigi kas tai yra?

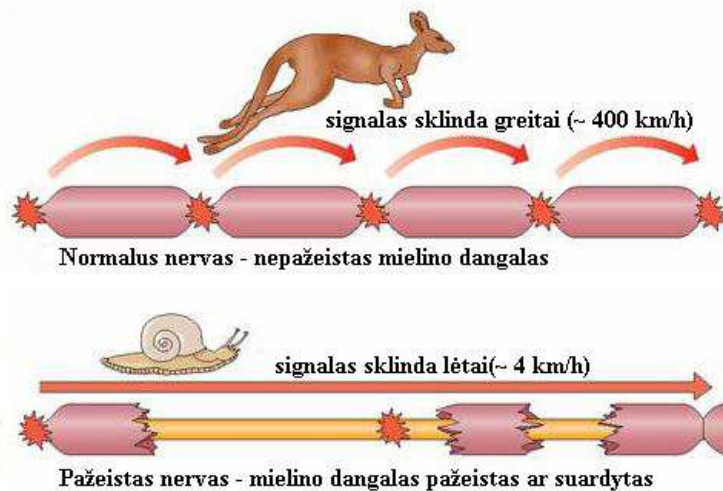
Yra žinoma, kad nervinė ląstelė sudaryta iš somos (kūnas), dendritų ir aksono (6 pav.)

(Kandel J. Eric 2000).



6 pav. Neurono sandara

Aksomu sklinda elektriniai impulsai, todėl labai svarbu, kad šis sklidimas vyktų be jokių nuotėkių. Tokį sklidimą užtikrina mielino dangalas, kuris izoluoja aksoną ir neleidžia elektros srovei nutekėti. Išsėtinės sklerozės atveju ant mielino dangalo atsiranda taip vadinamieji randai, dėl kurių elektriniai impulsai sklinda lėčiau arba išvis nepasiekia savo tikslo (7 pav.). <http://www.ms-gateway.com/my-life-with-ms/introduction/what-is-ms-179.htm>



7 pav. Signalų sklindimas pažeistu ir nepažeistu aksonu.

Susirgimo galimybė taip pat gali būti nulemta ir genetiškai, tačiau tai tik labai mažas dalis. Vieni mokslininkai mano, kad ši liga susijusi su baltymu, pamėgdžiojančiu mielino baltymą, kuris patenka į kūną viruso pagalba. Kiti – kad imuninė sistema pernelyg jautriai reaguoja į mielino baltymus pas sergančius IS, todėl autoimuninė liga linkusi progresuoti.

<http://www.mayoclinic.com/print/multiple-sclerosis/DS00188/DSECTION=all&METHOD=print>

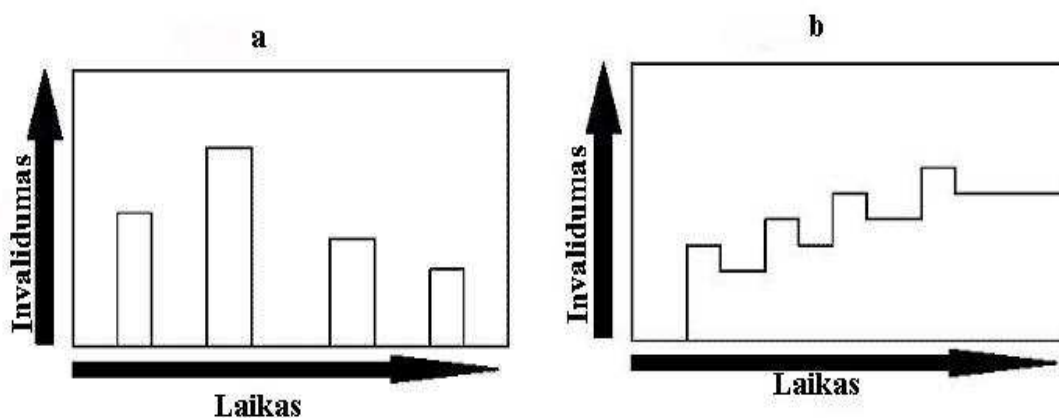
Demielinizacija – toksinės, imuninės, infekcinės kilmės ar įgimtas procesas, pažeidžiantis centrinės ir periferinės nervų sistemos mielina. Diseminuota sklerozė – dažniausia demielinizuojanti liga, įprastai pažeidžianti centrinę nervų sistemą ir makroskopiškai pasireiškianti sklerotinėmis plokštelėmis, kurių mikroskopinė išraiška – perivaskulinė įvairaus laipsnio monomorfonuklearų infiltracija, demielinizacija ir reaktyvi gliozė (Petroška D. 2001).

Tačiau kas gi sukelia demielinizaciją? Per pastaruosius dešimtmečius buvo atrasti trys įrodymai, pagrindžiantys hipotezę, kad IS sukelia infekcinės medžiagos. Pirmieji parodė tai,

kad virusai sukelia demielinizaciją pas eksperimentinius gyvūnus. Antrieji atėjo iš epidimologinių tyrimų, kurie parodė, kad IS atsiranda dėl terminuoto susidūrimo su tam tikru aplinkos faktoriumi, galimu patogenu. Ir tretieji įrodymai gauti iš žmogaus ligos, tai yra, kažkoks skaičius infekcinių veiksnių gali būti asocijuoti su PNS ar CNS demielinizacijos liga (Robert M. Herndon, M.D. 2002).

Tačiau kad ir kokios priežastys sukelia IS, ši liga turi keturis atsiradimo taip vadinamus modelius:

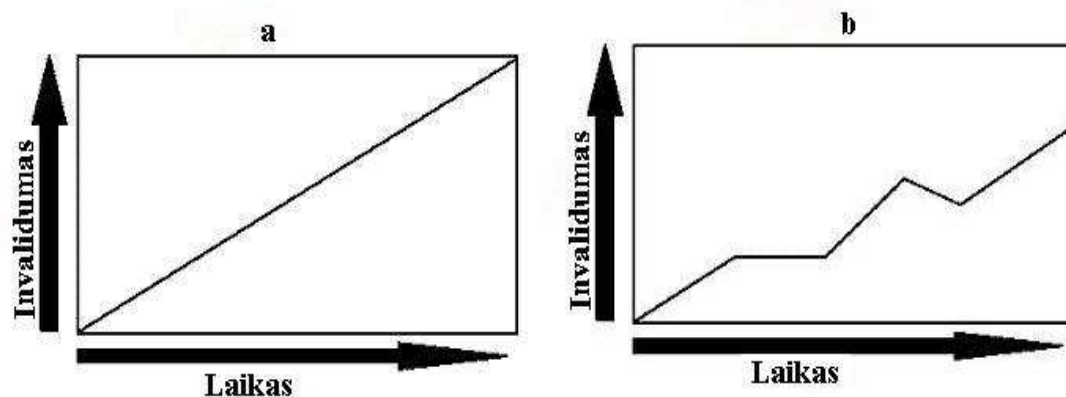
Recidyvuojanti – remituojanti išsėtinė sklerozė – šis IS tipas charakterizuojamas kaip aiškiai atsirandančiais paūmėjimais, kuriuos seka remisijos periodai. Paūmėjimai atsiranda staigiai, trunka kelias savaites ar mėnesius ir pamažu dingsta. Dauguma žmonių su šia IS šią formą turi diagnozavimo metu (8 pav.). (<http://www.mayoclinic.com/print/multiple-sclerosis/DS00188/DSECTION=all&METHOD=print>)



8 pav. Recidyvuojanti – remituojanti išsėtinė sklerozė. Visiškas pasveikimas (a). Dalinė remisija (b). <http://www.nationalmssociety.org/living-with-multiple-sclerosis/living-with-advanced-ms/progressive-disease/index.aspx>

Pirminė progresuojanti išsėtinė sklerozė – žmonės su šia ne taip dažnai pasitaikančia forma patiria laipsnišką pablogėjimą, be remisijos periodų. Žmonės, turintys šią IS formą dažniausiai vyresni nei 40 metų, kai pasireiškia pirmi simptomai.

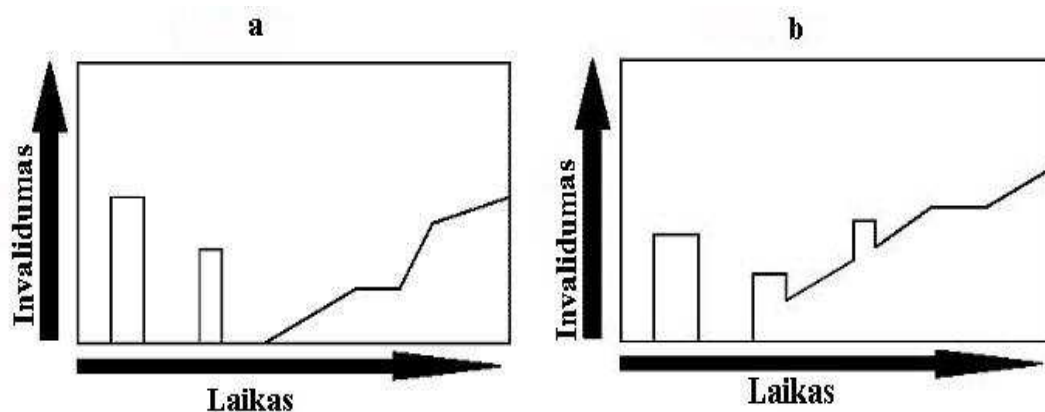
(<http://www.mayoclinic.com/print/multiple-sclerosis/DS00188/DSECTION=all&METHOD=print>)



9 pav. Pirminė progresuojanti išsėtinė sklerozė. Nėra remisijos (a). Laikinas pagerėjimas (b).
<http://www.nationalmssociety.org/living-with-multiple-sclerosis/living-with-advanced-ms/progressive-disease/index.aspx>

Antrinė progresuojanti išsėtinė sklerozė – daugiau nei pusė žmonių, turinčių recidyvuojančią – remituojančią formą galiausiai pereis į būseną nepertraukiamo pablogėjimo. Ši būseną vadinama antrine progresuojančia IS.

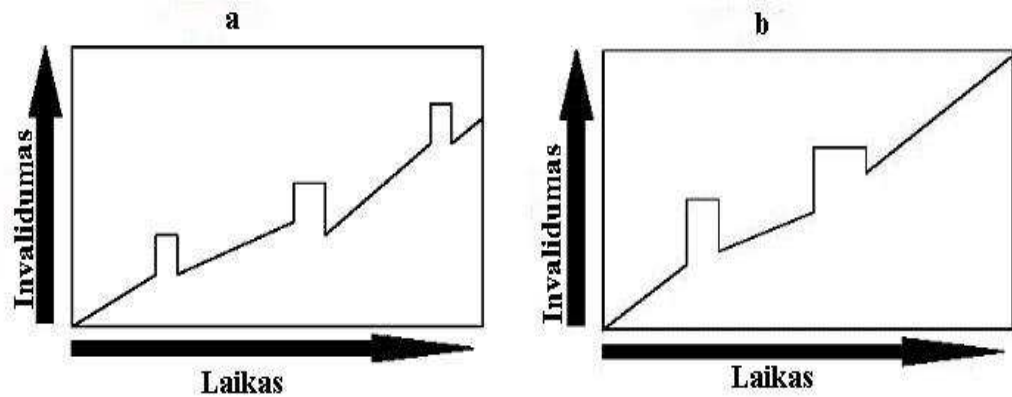
(<http://www.mayoclinic.com/print/multiple-sclerosis/DS00188/DSECTION=all&METHOD=print>)



10 pav. Antrinė progresuojanti išsėtinė sklerozė. Invalidumo progresavimas (a). Galima nežymi remisija ir stabilizavimas (b). <http://www.nationalmssociety.org/living-with-multiple-sclerosis/living-with-advanced-ms/progressive-disease/index.aspx>

Progresuojanti – recidyvuojanti išsėtinė sklerozė – tai pažangiausia IS forma su staigiais epizodais naujų simptomų ar jau esamų pabloginimas.

(<http://www.mayoclinic.com/print/multiple-sclerosis/DS00188/DSECTION=all&METHOD=print>)



11 pav. Progresuojanti – recidyvuojanti išsėtinė sklerozė. <http://www.nationalmssociety.org/living-with-multiple-sclerosis/living-with-advanced-ms/progressive-disease/index.aspx>

1.1.3 T reguliacinių ląstelių vaidmuo išsėtinėje sklerozėje

T ląstelės – tai kraujo ląstelės, priklauso leukocitų agranulocitų grupei, kitaip dar vadinami T limfocitai. Sudaro 70 % visų limfocitų. Šios ląstelių grupės pavadinimas kilęs nuo užkrūčio liaukos (angl. thymus), kurioje vyksta jų brendimas. T limfocitai yra 7-12 μm skersmens, nefagocituojančios ląstelės, turinčios didžiulį branduolį, užimantį beveik visą citoplazmą. T limfocitai organizme lemia ląstelinį imunitetą t.y. naikina užkrėstas ir vėžines ląsteles, taip pat svarbūs imuniteto reguliacijai.

T reguliacinės (Treg) ląstelės apibūdinamos kaip turinčios lemiamą vaidmenį CNS autoimuninės sistemos patogenezėje. Treg panaikinimas sukelia spontaniinę autoimuninę ligą pas peles, tuo tarpu Treg priaugimas gali sustabdyti EAE vystimąsi.

T reguliacinių ląstelių vystymasis ir funkcionavimas yra susijęs su dendritinėmis ląstelėmis, kurios atlieka pagrindinį vaidmenį aktyvuojant ir reaktyvuojant encefalitogenines ląsteles centrinėje nervų sistemoje. Todėl ir T reguliacinės ir dendritinės ląstelės yra potencialūs terapiniai taikiniai gydant išsėtinę sklerozę.

Manoma, kad viena priežasčių tai sutrikusi pusiausvyra tarp ląstelių, kurios sukelia audinio pažeidimą bei demielinizaciją (aktyvuotos efektorinės T ląstelės) ir ląstelių, sugebančių slopinti save reaktyvuojančių T ląstelių funkciją (reguliacinės T ląstelės). (Alla L Zozulya and Heinz Wiendl 2008)

1.2 Diagnostika

Diagnozuoti IS nėra paprasta. Daugelis žmonių gyveno nežinodami, kad serga. IS turi daugiau nei 50 simptomų ir pas kiekvieną žmogų jie pasireiškia skirtingai. Dauguma simptomų tiesiog pamėgdžioja kitų ligų simptomus. Nustatyti šiai ligai neatliekami jokie kraujo testai. Dažnai simptomai atsiranda ir pranyksta. Todėl buvo priimti tam tikri kriterijai, pagal kuriuos buvo nustatoma ši liga. Vieni seniausių yra žinomi Schumacher kriterijai vėliau buvo atnaujinti – Poser kriterijai. Dabar plačiai naudojami McDonald kriterijai, pasiūlyti 2001 metais. Tačiau tai tik klinikiniai ligos nustatymai. Tačiau tai tik klinikinė diagnostika. Kad tiksliai atpažinti šią ligą reikalingi kur kas rimtesni metodai nei simptomų stebėjimas. MR, juosmens punkcija, sukeltieji potencialai – visa tai tyrimo metodai, naudojami nustatant IS.

1.2.1 Diagnostiniai kriterijai

Literatūroje minimi trys pagrindiniai kriterijai:

- kriterijai pagal Schumacher (1965 m.)
- kriterijai pagal Poser (1983 m.)
- kriterijai pagal McDonalds (2001 m.)

Schumacher kriterijai tai diagnostinių kriterijų rinkinys, kuris buvo sukurtas 1965 metais ir iki šiol dar naudojamas nustatant IS. Vėliau, 1983 metais jis buvo atnaujintas – kriterijai pagal Poser. Ir galiausiai 2001 metais tarptautinės diskusijos metu, bendradarbiaujant su Amerikos NMSS (National Multiple Sclerosis Society) buvo pasiūlytas McDonaldo kriterijus (1 lentelė), kuris turėtų pakeisti ankščiau buvusius. (<http://www.multiple-sclerosis.org/DiagnosticCriteria.html>).

McDonald kriterijus skiriasi nuo ankstesnių tuo, kad į jo schemą yra įtrauktas MRI, kuris palengvina IS diagnozavimą. (M. Tintoré, MD; et al 2003).

McDonald kriterijuje esantis modifikuotas Barkhof kriterijus, kuris apibrėžia sklidimą laike ir erdvėje yra labai specifinis. Jis teigia, kad norint atlikti MRI, reikia būti gerai įsitikinusi, kad pas pacientą diagnozuota IS, tam, kad išvengti nereikalingo interferono naudojimo. Mažiausiai 3 iš keturių Barkhof kriterijų turi būti pristatyti, tam kad atlikti MRI. Šie kriterijai reikalingi tam, kad išvengti galimos IS virsmo į aiškia IS (<http://www.radiologyassistant.nl/en/4556dea65db62#a459bf2fc34950>).

Klinika (paūmėjimai)	Objektyvūs pažeidimai	Papildomi reikalavimai diagnozės nustatymui
2 arba daugiau	2 arba daugiau	Nėra; užtenka klinikinių įrodymų
2 arba daugiau	1	Išplitimas plote MRT arba teigiamas likvoras ir 2 ar daugiau MRT pažeidimai suderinami su IS arba paūmėjimas pasireiškiantis priešingoje pusėje
1	2 arba daugiau	Išplitimas laike MRT arba antras klinikinis paūmėjimas
1 (mono-simptomatinė)	1	Išplitimas plote MRT arba teigiamas likvoras ir 2 ar daugiau MRT pažeidimai suderinami su IS IR Išplitimas laike MRT arba antras klinikinis paūmėjimas
0 (progresavimas nuo pradžių)	1	Teigiamas likvoras IR Išplitimas plote MRT, stebimi 9 ar daugiau T2 galvos smegenų pažeidimai arba 2 ar daugiau nugaros smegenų pažeidimai arba 4-8 galvos smegenų pažeidimai arba teigiami sukelti potencialai su 4-8 galvos smegenų ir 1 nugaros smegenų pažeidimu arba teigiami sukelti potencialai su mažiau nei 4 galvos smegenų pažeidimais ir 1 nugaros smegenų pažeidimas IR Išplitimas laike MRT arba pastovus progresavimas 1 metus

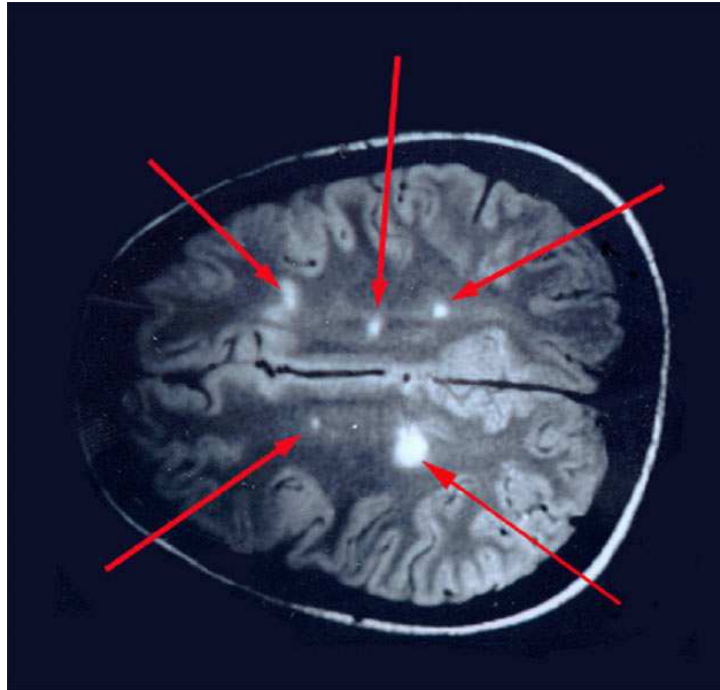
1 lentelė. Kriterijai pagal McDonald (<http://is.santa.lt/default.asp?pusl=n05>).

1.2.2. MRT

Magnetinio rezonanso tyrimas labai svarbus ne tik diagnozuojant IS, taip pat stebint progresavimą ir apibrėžiant gydymą. Magnetinio rezonanso tomografija aptinka šviesius plotelius, kurie parodo, kad yra pažeidimų.

<http://health.nytimes.com/health/guides/disease/multiple-sclerosis/diagnosis.html>

Uždegiminiai pažeidimai vizualizuojami MRT kaip aktyvios plokštelės. (Budrys V. 2001)

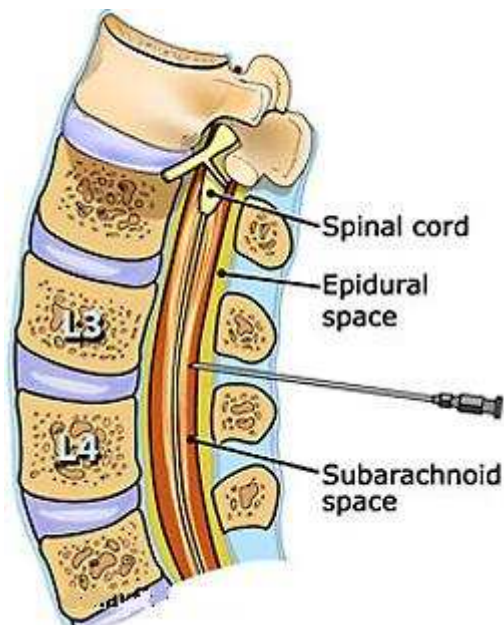


12 pav. Rodyklės rodo pažeidimus. http://onprc.ohsu.edu/education/dspStudentsItem.cfm?doc_id=229

1.2.3 Juosmens punkcija

Juosmeninė punkcija – tai invazinė procedūra naudojama smegenų skysčiui paimti. Adata įvedama tarp trečio ir ketvirto juosmens slankstelių.

<http://health.nytimes.com/health/guides/disease/multiple-sclerosis/diagnosis.html>



13 pav. Juosmeninė punkcija

Juosmens punkcija naudojama IS diagnozei patvirtinti ar paneigti. Iš likvoro mėginių galima atlikti keletą tyrimų. Tiriant likvorą, daugumai žmonių, kuriems nustatyta IS (90 proc.), randama ligai būdingų požymių, kurie nurodo IS aktyvumą. (<http://www.is-centras.lt>)

1.2.4 Sukeltieji potencialai

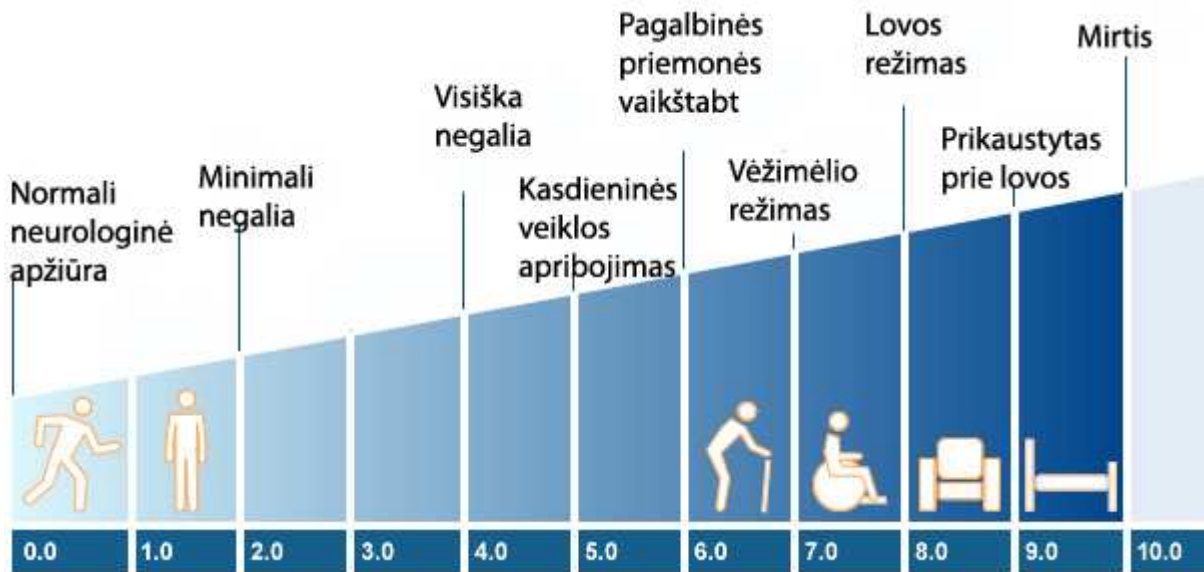
Sukeltųjų potencialų tyrimas yra paprastas ir nesukeliantis skausmo testas. Šio tyrimo esmė ištirti nervo funkciją, tai yra nustatyti kiek laiko užtruks elektriniam impulsui nukeliauti iš akies, ausies ar odos iki smegenų. <http://health.nytimes.com/health/guides/disease/multiple-sclerosis/diagnosis.html>

Dažniausiai nustatant IS naudojami vizualiniai sukeltieji potencialai (VEP). VEP matuoja laiką, per kurį iš optinio nervo perduodama informacija į galvos smegenų zoną, atsakingą už pirminį regėjimo informacijos apdorojimą. (<http://www.is-centras.lt>).

1.2.5 EDSS

EDSS (The Expanded Disability Status Scale) – išplėstinė negalios įvertinimo skalė. Šis diagnozavimo metodas naudojamas neurologų nustatyti išsėtinės sklerozės negalios progresavimą ir įvertinti gydymo efektyvumą.

EDSS rezultatai generuojami naudojant funkcinės sistemos rodiklius. Funkcinės sistemos (FS), kurių yra 7, susijusios su CNS įvairiom funkcijom, tokiom kaip regėjimo, sensorinė ir kt. funkcijos. (<http://www.mult-sclerosis.org/expandeddisabilitystatusscale.html>)



14 pav. EDSS - išplėstinė negalios įvertinimo skalė.

1.3 Gydymas

Sergantieji IS patiria įvairius simptomus, kurie dažnai trukdo kasdieninėje veikloje. Vieni dažniausiai patiriamų simptomų yra nuovargis. Apie 55 % procentų sergančiųjų patiria skausmą. Kol dar neatrasti jokie vaistai šiai bausiai ligai, naudojami visi įmanomi būdai, kad sulėtint ligos progresavimą, sumažint skausmą bei kuo labiau numalšint kitus simptomus. Tam naudojama įvairi terapija, vaistai ir net gi marihuana.

1.3.1 Terapija

Kovojant su stipriais priepoliais naudojamas metilprednisolonas intraveniškai (po 500 mg į dieną 5 dienas). Buvo pastebėta, kad didelės dozės pagerindavo būseną sergančių chroniška progresyvia IS.

IS taip pat gydoma ir β Interferonais. Buvo nustatyta, kad jie sumažina ligos recidyvų dažnį ir sumažina pažeidimų, matomu MRT sankaupas pas sergančius recidyvuojančia – remituojančia išsėtine skleroze. Gydant β Interferonais pasireiškia šalutiniai poveikiai, būdingi peršalimui.

Kitas gydymo budas – kopolimeru I. Kopolimeras I sudarytas iš keturių aminorūgščių ir reaguoja su BMP. Pagerina neveiksmingumą pas sergančius recidyvuojančia – remituojančia išsėtine skleroze. (M.P. Pender 1996)

1.3.2 Simptominė terapija

Susilpnintas judrumas ir fizinis gabumas: pacientams, kuriems sunku vaikščioti rekomenduojama fizioterapija, o tiems, kuriems sunku atlikti kasdieninius fizinius darbus, siūlomi įvairūs prietaisai, kurie gali padėti.

Spazmiškumas: kad sumažinti spazmiškumą, kuris dažniausiai pasireiškia apatinėje kūno dalyje, siūloma pašalinti visus erzinančius veiksnius – šlapimo takų infekcija, vidurių pūtimas ir pan. (M. P. Pender 2000)

1.3.3 Kamieninės ląstelės

Šiuo metu pasaulyje atliekama daug tyrimų su kamieninėmis ląstelėmis. Taip pat vykdomi eksperimentai ir su Išsėtine skleroze, taikant kamienines ląsteles. Kamieninių ląstelių pagalba galima atstatyti pažeistų nervinių ląstelių funkcijas. Jos padidina glia ląstelių skaičių, kurios gamina mieliną. Tyrimai parodė, kad kamieninės ląstelės, suleistos pelėms, atstato smegenų ląsteles, pažeistas esant ligai, panašiai į Išsėtinę sklerozę.

(<http://www.medicalnewstoday.com/articles/17188.php>)

Kamieninių ląstelių persodinimas laikomas perspektyvia pažeistų audinių arba organų funkcijų atstatymo strategija. Labiausiai paplitęs kamieninių ląstelių šaltinis yra kaulų čiulpai. Kamieninių ląstelių buvo aptikta ir daugumoje kitų organizmo audinių, tačiau kiekiai yra labai maži, be to reikalingos invazinės procedūros, savanoriai donoriai arba laikas, kol paciento ląstelės padauginamos in vitro sąlygomis. (<http://www.ekmi.vu.lt/Klasteles/lasteles.htm>).

Tyrimai parodė, kad taikant gydymą kamieninėmis ląstelėmis, buvo sumažinti IS simptomai. Taip pat atsistatė pusiausvyrą, dėl kurios sutrikimo buvo sunku judėti.

(http://www.timesonline.co.uk/tol/life_and_style/health/article5614644.ece)

1.4 Gyvūnų modelis Išsėtinei sklerozei tirti

1.4.1 EAE

Daugumos nuomone IS yra autoimuninė liga. Šios ligos priežastys aptarinėjamos nuo tų laikų. Kai tik pirmą kartą buvo aprašyta IS. Mielino pažeidimas atsiranda dėl imuninės atakos, kuri susideda iš kelių takų ir molekulių, vedančių prie CNS funkcijų silpnėjimo. Pas IS pacientus buvo atrasti antikūniai ir automatiškai reaguojančios T-ląstelės, kurios veikia prieš mielino antigenus, tokius kaip pagrindinis mielino baltymas (MBP), protolipidinis baltymas (PLP) ir mielino oligodendrocitų glikoproteinas (MOG). Gyvūnų modelio panaudojimas labai padėjo bandant iširti šią ligą. IS naudojamas tam specialus gyvūno modelis – Eksperimentinis autoimuninis encefalomyelitas (EAE) dar kartais vadinamas Eksperimentiniu alerginiu encefalomyelitu. Mielino komponentai buvo sumaišomi su Freund'o adjuvantu (CFA) ir visa tai suleista gyvūnui sukeldant autoimuninę ligą. (Nikolaos Grigoriadis and Georgios M Hadjigeorgiou 2006).

EAE yra poligeninė chroniška uždegiminė nervų sistemos demielinizacijos liga, kuri apjungia savyje ir genetinius ir aplinkos faktorius (Eilhard et al 2002).

EAE nėra išsėtinė sklerozė, tačiau ji labai artima jai. Gyvūnui suleidžiami įvairūs baltymai, kurie sudaro mielina. Šie baltymai paveikia autoimuninį atsaką, tai yra, autoimuninė sistema pradeda atakuoti pati save. Mielino dangalas naikinamas, taip sudarant IS modelį.

<http://www.mult-sclerosis.org/experimentalautoimmuneencephalomyelitis.html>

EAE privalumai:

- Tai gyvūnų modelis, leidžiantis tyrinėti demielinizacijos ligas;
- Leidžia tyrinėtojams iškoti potencialių vaistų;
- Leidžia varijuoti EAE panaudojimą ieškant IS sukėlėjų.

EAE trūkumai:

- EAE nėra išsėtinė sklerozė;
- Neabejotinai gyvūnui kenčia ir todėl kyla daug etinių klausimų.

<http://www.mult-sclerosis.org/experimentalautoimmuneencephalomyelitis.html>

1.4.2 EAE rūšys

EAE modelis plačiai naudojamas tiriant IS. Yra kelios EAE rūšys:

MOG – sukeltas EAE – sukelti ligai naudojami mielino oligodendrocitai.

PLP – sukeltas EAE – protolipidinių baltymų dalys (PLP-139-151), kurios randamos tik mieline naudojamos sukelti ligai kartu suleidžiant ir kokliušo toksiną. Šis modelis gali būti sustabdomas po 21 dienos arba tęsiamas toliau.

MBP – sukeltas EAE – MBP, didžiausia dalis esanti mieline, naudojama sukelti ligai. Šis modelis limituotas ir trunka 14-20 dienų.

<http://www.mdbiosciences.com/multiple-sclerosis-MS-EAE-In-vivo-Models-inflammation-service-cro-1.html>

2. Eksperimentas

Lietuva taip pat prisideda prie IS tyrimu. Viena iš vykdytojų yra UAB „Imunolita“. Šiuo metu UAB „Imunolita“ (projekto partneris) bei UAB „Vitlita“ (projekto pareiškėjas) vykdo ES Struktūrinių Fondų bei Lietuvos Respublikos dalinai remiamą projektą „Nauja išsėtinės sklerozės gydymo technologija paremta vakcinacija autologinėmis T-ląstelėmis“. Lygiagrečiai su šiais tyrimais buvo atliekami elektrofiziologiniai tyrimai.

2.1 Eksperimento eiga

Laikotarpiu 2007 11 – 2008 02 buvo atliekami elektrofiziologiniai matavimai. EAE metodu buvo užkrėsta 31 triušis. EMG buvo matuojama kartą į savaitę. Pagrindiniai parametrai, kurie buvo matuojami tai H refleksas ir M banga. Per visą šį laikotarpį triušiai buvo gydomi T ląstelėmis ir kaulų čiulpais. Mūsų pagrindinis tikslas buvo stebėti kaip keičiasi H ir M parametrai progresuojant ligai.

2.2 EMG

Elektromiograma (EMG) – raumenų elektrinio aktyvumo matavimas. Šis matavimas naudojamas diagnozuoti raumenų ligas ir kitas. Taip pat plačiai naudojamas sporte, kadangi

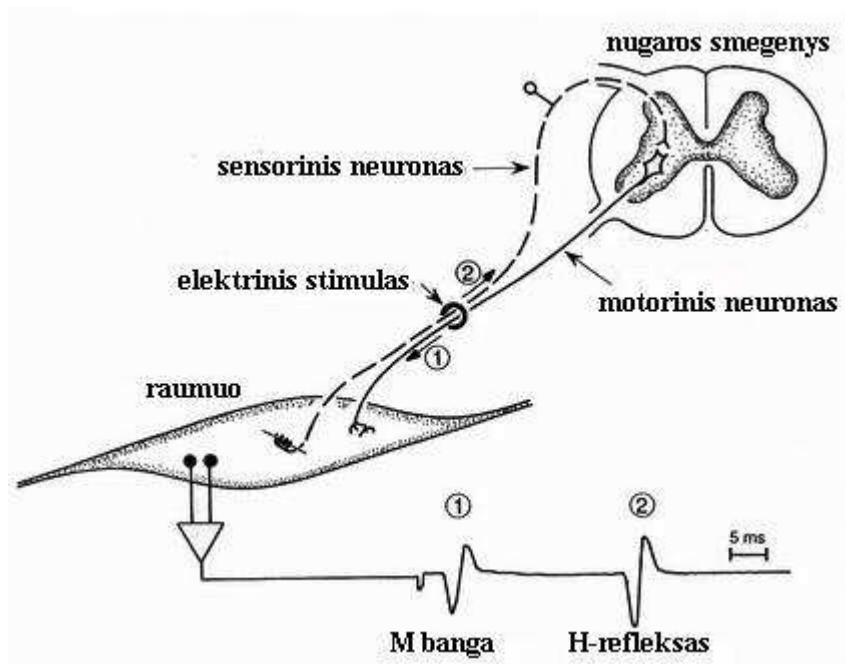
bet kuris sportas susijęs su raumenų aktyvumu. EMG matuoja veikimo potencialus raumenyje arba raumenų grupėje.

2.2.1 H reflekso ir M bangos kelias

H - refleksas pirmą kartą buvo aprašytas Paul Hoffmann'u 1910 metais. Šis refleksas yra elektrikai sukeltas refleksas, analogas mechaniškai sukeltam tempimo refleksui.

M banga vadinamas raumens atsakas (muscle responses) .

Elektrikai stimuliuojant nervą, veikimo potencialai sklinda išilgai aferentiniu neuronu. Pasiekę nugaros smegenis, jie iššaukia žadinančius postsinapsinius potencialus, kurie sukelia veikimo potencialus. Šie grįžta atgal per α MT, kur pasiekę raumenį sukelia raumens trūkčiojimą. (Riann M. Palmieri 2004).



15 pav. H reflekso ir M bangos kelias

Dėl atitinkamai trumpo kelio, kurį turi įveikti veikimo potencialai, raumens atsakas (M banga) matuojant EMG pasirodo greičiau dėl trumpesnės latencijos. H reflekso latencija priklauso nuo atstumo tarp raumens ir nugaros smegenų. Kuo atstumas trumpesnis, tuo latencija trumpesnė. (Riann M. Palmieri 2004).

2.2.2 H/M santykis

Matuojant EMG iš H ir M verčių nedaug ką galima pasakyti. Todėl imamas šių verčių maksimumų – H_{\max}/M_{\max} - santykis. Kur H_{\max} yra maksimali reflekso reikšmė, kuri rodo

skirtingų motorinių neuronų maksimalų sužadimą, M_{max} vaizduoja maksimaliai aktyvuoto raumens atsaką.

H_{max}/M_{max} santykis yra dažnai naudojamas kaip priklausomas matas, kai duomenys yra įrašomi daugiau nei vieną kartą. Priimta imti tokį santykį dėl stimulatoriaus judėjimo ar elektrodo, kadangi dėl judėjimo gali pakisti stimuliuojama vieta (Riann M. Palmieri 2004).

Sergant IS šis santykis progresuojant ligai keičiasi. H amplitudė mažėja, arba išvis išnyksta (Lagarce F et al. 2005).

2.3 Metodika

Tyrimo objektas: eksperimente buvo panaudoti vienodo amžiaus, subrendę 32 Burgundų linijos triušiai. Svoris - $2,443 \pm 0,312$ kg.

Eksperimentas:

Triušiai buvo užkrėsti liga, artima išsėtinei sklerozei plačiai naudojamu EAE metodu. Vėliau buvo gydomi T ląstelėmis ir kaulų čiulpais. Mūsų darbas buvo atlikti nepriklausomus elektrofiziologinius matavimus.

Įranga:

1. Kompiuterizuotas poligrafas „BIOPAC Systems, Inc.“ (MP35).
2. Stimulatorius (BSLSTMB)
3. Kompiuteris
4. Neinvaziniai elektrodai

Anestezija:

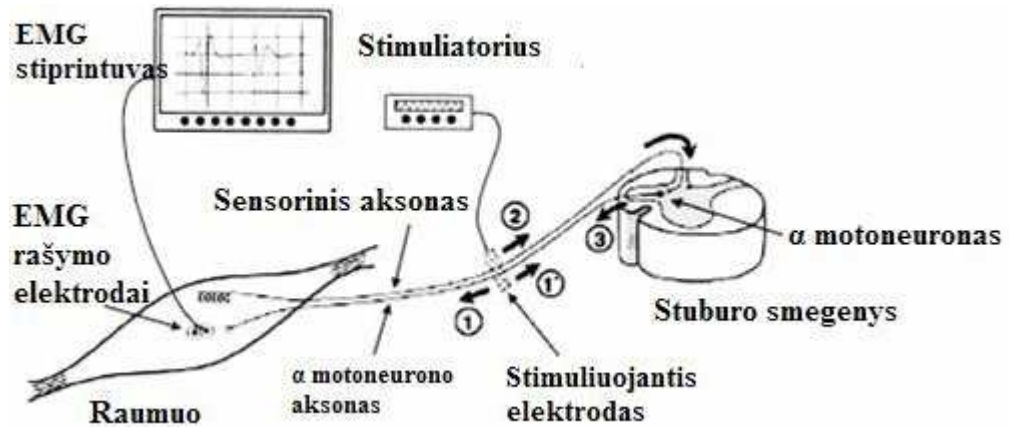
Anestezijai buvo panaudotas BIOKETAN (Vetoquinol, Lenkija, 115,34 mg/ml ketamino dichlorido, 1 mg/ml benzetonio chlorido ir iki 1ml injekcinio vandens). Pagal svorius buvo apskaičiuotos reikiamos dozės - 0,15 mg/kg ketamino ir 0,125 mg/kg ksilazino. Skaičiavimai atlikti remiantis vaisto anotacija bei knygoje „Laboratory Animal Anaesthesia“ pateiktomis rekomendacijomis (Fleckell P.A., 1996).

Svoris:

Svorio mažėjimas – tai vienas iš IS simptomų, todėl kiekvieną savaitę visi triušiai buvo sveriami. Kadangi anestezuojant dėl svorio kitimo kito ir vaistų dozės.

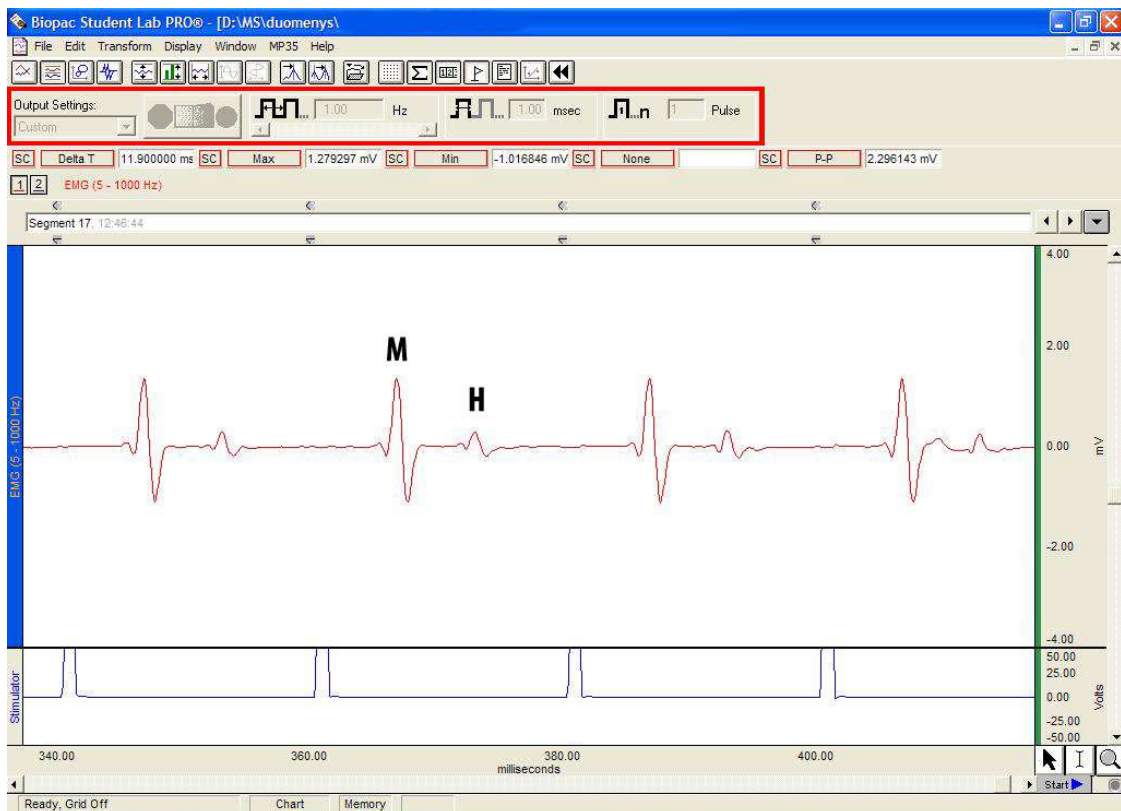
Eiga:

Eksperimentas vyko 2007 11 09 iki 2008 02 22. Matavimai buvo atliekami kas 7 dienas. Triušis anestezuojamas, prijungiami elektrodai pagal schemą (16 pav.) ir matuojama EMG. Iš viso buvo atlikta 16 eksperimentų. Vieno registravimo trukmė 5-7 min.



16 pav. eksperimento schema

Elektromiogramos užrašymui buvo naudojamas poligrafas Biopac System Inc.



17 pav. Elektromiograma, registruojama su Biopac System inc poligrafu.

IS sukėlimo ir gydymo metodika

Eksperimente buvo panaudoti 32 triušiai, kurie buvo suskirstyti į 5 grupes (lentelė). Visoms grupėms skyrėsi IS sukėlimo būdas bei gydymas.

Grupė	Sukėlimo metodas	Gydymas
K1	Suleista 1,63 ml fiziologinio buferio + 1 ml ICF + 3 mg <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Negydomi
K2	Suleista 8 mg grubaus smegenų lizato + 4 mg MBP + 1 ml ICF + 3 g <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Negydomi
K3	Suleista 8 mg grubaus smegenų lizato + 4 mg MBP + 1 ml ICF + 3 g <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Taikomas gydymas imunizuojant mielino baltymais aktyvuotais defektyviais autoreaktyviais T – limfocitais
K4	Suleista 8 mg grubaus smegenų lizato + 4 mg MBP + 1 ml ICF + 3 g <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Taikomas gydymas suleidžiant kaulų čiulpų ląsteles
K5	Imunizuojami fiziologiniu tirpalu. Kontrolinė grupė	Taikomas gydymas imunizuojant mielino baltymais aktyvuotais autoreaktyviais T - limfocitais

2 lentelė. Nurodytas koks sukėlimo metodas ir gydymas buvo taikomas skirtingoms grupėms.

Statistinė analizė

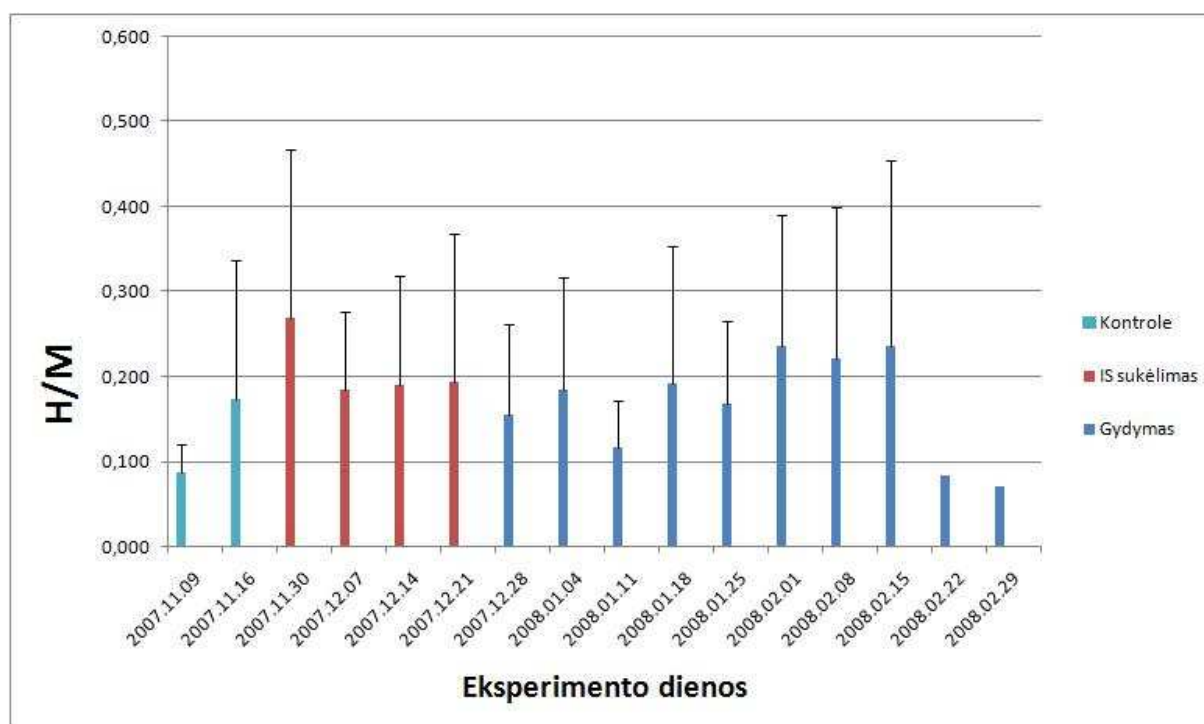
Eksperimentui pasirinkta imtis nėra didelė statistiniu požiūriu, dėl to patikrinti ar atitinka normalumo sąlygą buvo neįmanoma. Todėl analizė buvo atlikta remiantis neparametrinių kriterijų sąlyga, kuri taikoma mažoms imtims. Duomenų analizei buvo naudojamos MC Excel ir Statistica programos. Duomenų statistiniam palyginimui buvo naudojamas Vilkoksono suderintųjų porų testas (Wilcoxon's matched pairs test)

3. Rezultatai

Atlikus matavimus ir apdorojus duomenis buvo analizuojamas H/M santykio kitimas per visas 16 eksperimento savaitių. Buvo analizuojamas kiekvienas triušis atskirai, bei grupės, kurios buvo taip pat palyginamos tarpusavyje. Statistinei analizei atlikti buvo skaičiuojami H/M santykių vidurkiai kiekvienai grupei, bei standartiniai nuokrypiai. Taip pat buvo lyginamas kitimas tarp trijų eksperimento etapų - kontrolės (pirmos 2 savaitės), IS sukėlimo ir gydymo. Analizė buvo atlikta su programomis MS Excel ir Statistica.

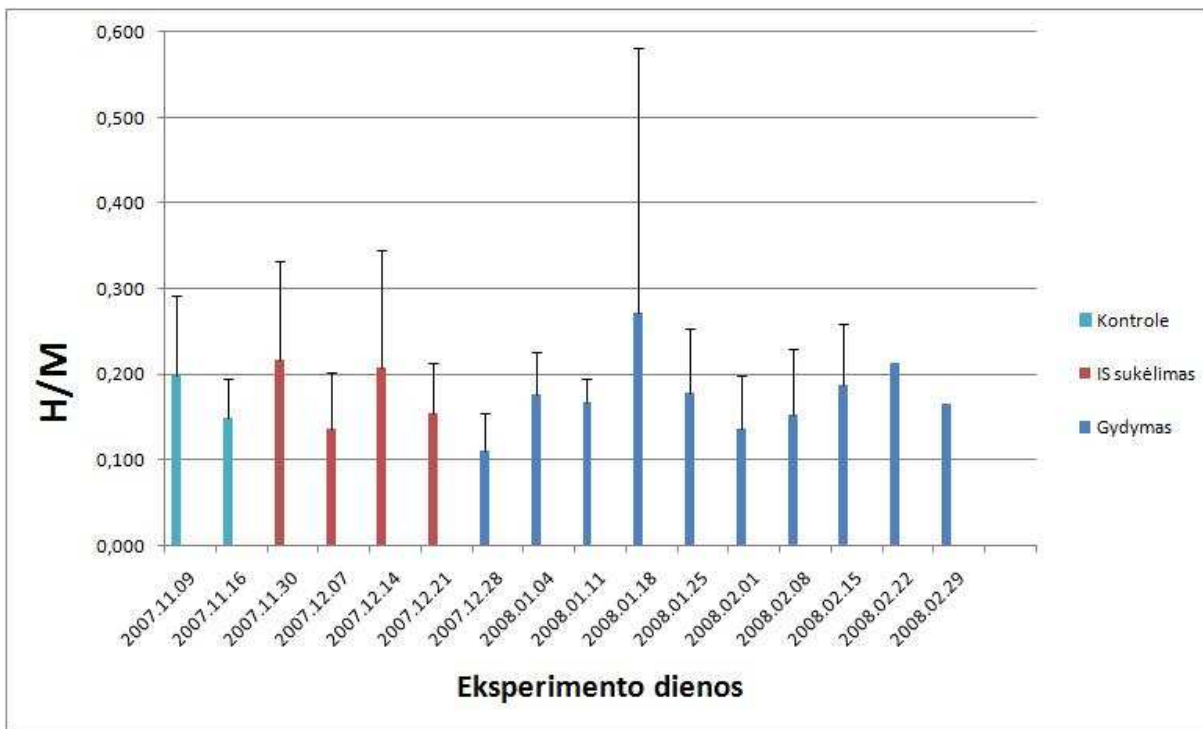
3.1 H/M parametrų analizė

Atlikus Vilkoksono suderintųjų porų testą, buvo nustatyta, kad K1 grupės H/M santykių vidurkiai patikimai nekito per visą eksperimento laikotarpį (18 pav.).



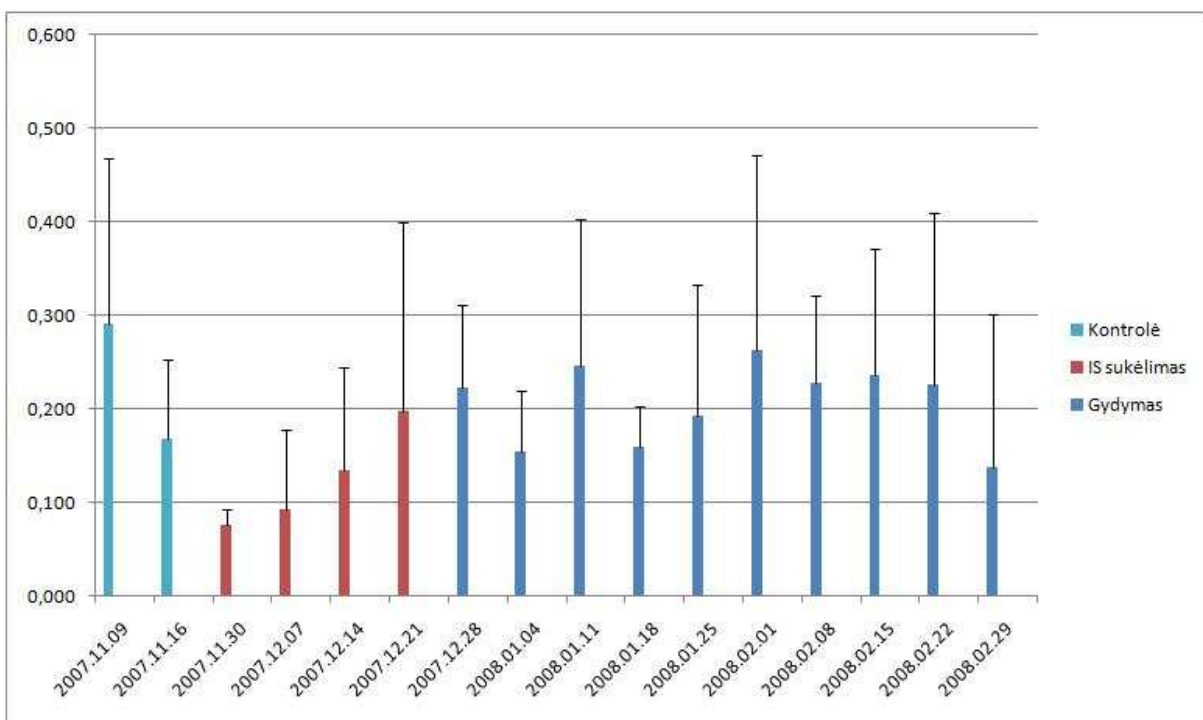
18. pav. K1 grupės H/M vidurkių santykis per visą eksperimento laikotarpį.

Toks pat rezultatas gaunamas ir išanalizavus K2 grupę. H/M santykiai statistiškai patikimai nekito (19 pav.).



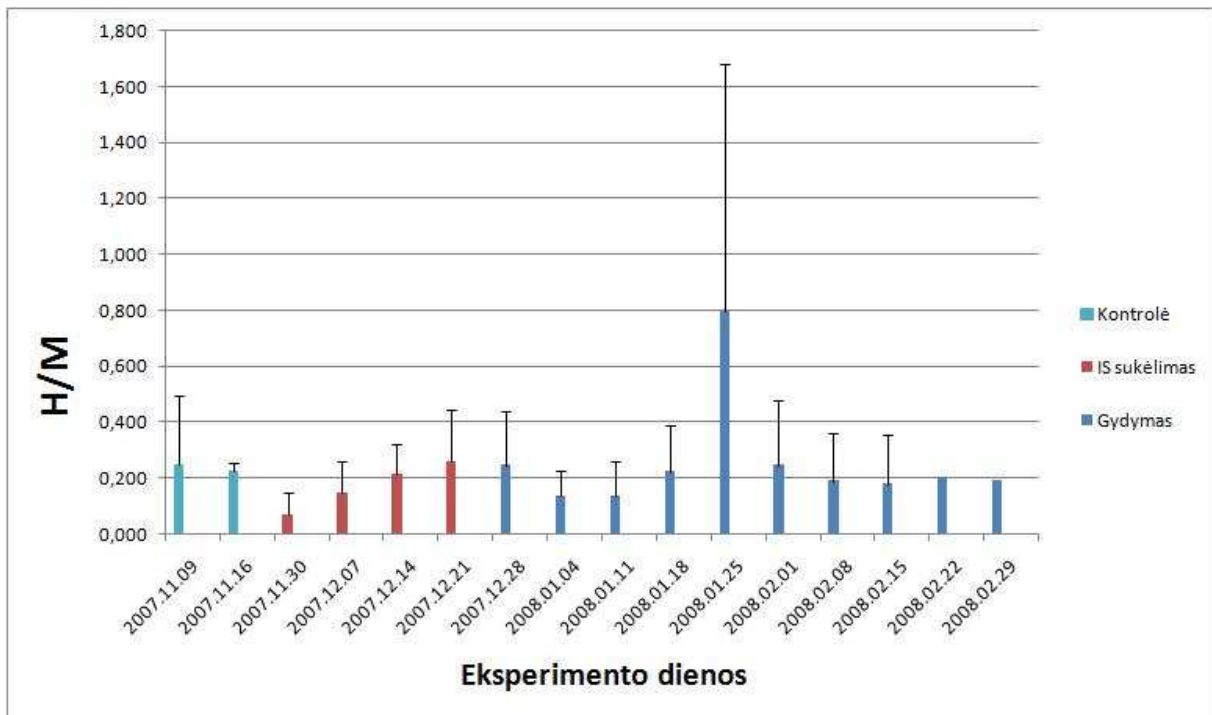
19 pav. K2 grupės H/M vidurkių santykis per visą eksperimento laikotarpį.

Išanalizavus K4 grupę rezultatai gaunami tokie patys. Nors ši grupė skiriasi nuo kitų tuo, kad buvo taikomas gydymas, tačiau H/M santykių kitimas taip pat statistiškai patikimai nesiskiria (20 pav.).



20 pav. K4 grupės H/M vidurkių santykis per visą eksperimento laikotarpį.

Kadangi K5 grupė buvo kontrolinė, jai nebuvo sukeliama IS, tačiau buvo taikomas gydymas. Išanalizavus duomenis nustatyta, kad H/M santykių vidurkiai statistiškai patikimai nekito per visą eksperimento laikotarpį (21 pav.). Tačiau šioje grupėje išsiskyrė 12 savaitė, kur buvo pastebėtas stiprus H/M santykio padidėjimas. Kadangi likusių 5 savaitių duomenys nieko nesiskyrė nuo prieš tai buvusių, darome prielaidą, kad šio padidėjimo priežastis gali būti techniniai nesklandumai.



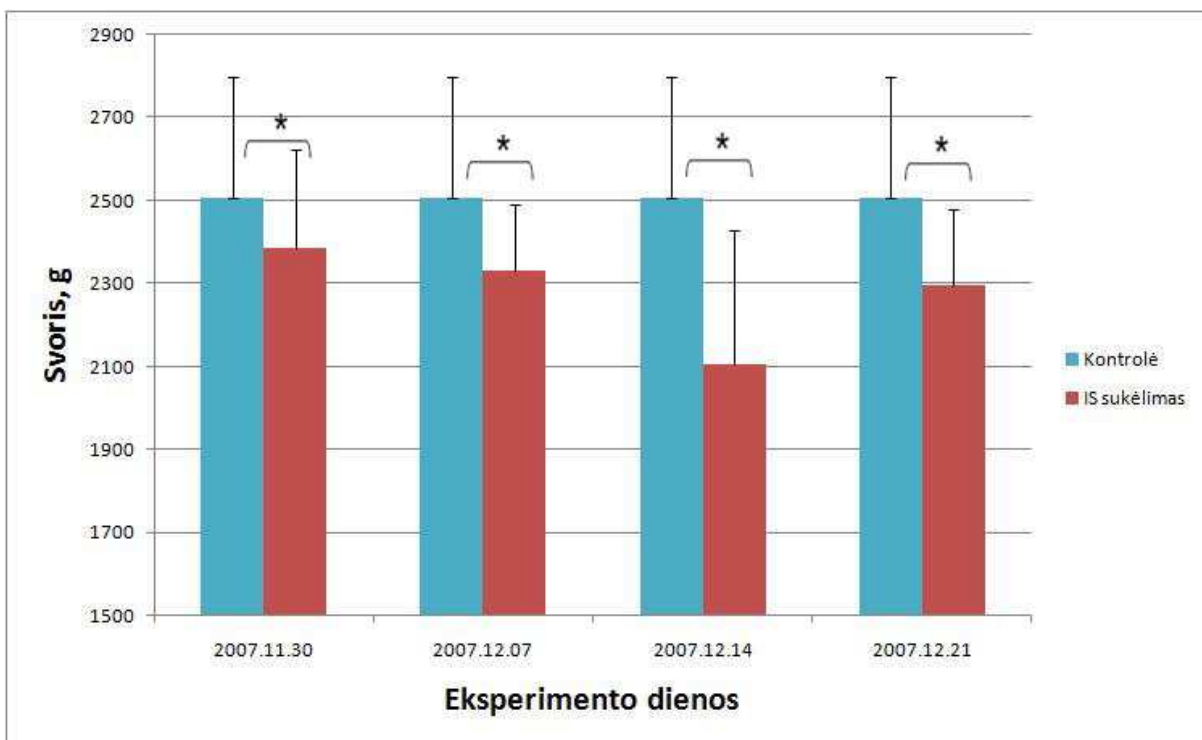
21 pav. K5 grupės H/M vidurkių santykis per visą eksperimento laikotarpį.

Taigi išanalizavus atskirų grupių H/M santykius pasirinktose grupėse, gavome, kad jie statistiškai patikimai nekito per visą eksperimento laikotarpį. Kadangi K1 ir K2 grupėms nebuvo taikomas joks gydymas, šių triušių būklė negerėjo.

3.2 Svorio kitimas

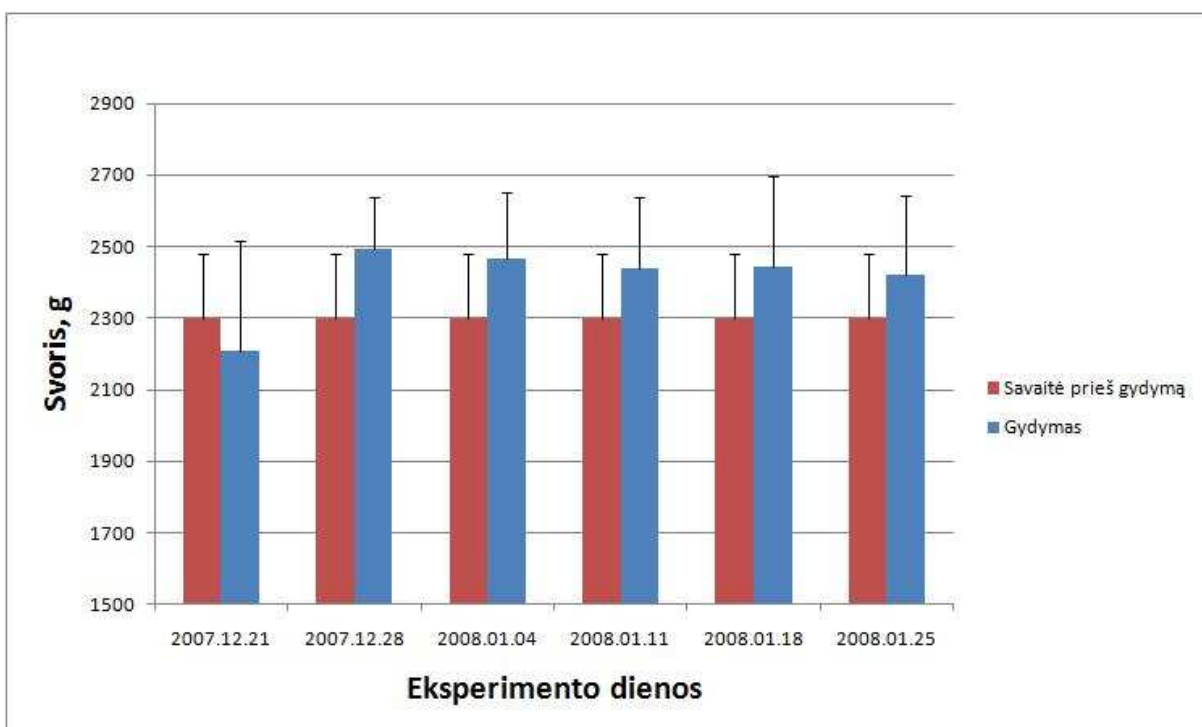
Svorio kitimo analizė buvo atlikta paskaičiavus svorio vidurkius grupėse skirtingais eksperimento laikotarpiais – prieš susargdinimą, po ir pradedant gydymą.

Išanalizavus K1 grupę, gavome kad po IS sukėlimo svoris per tris savaites statistiškai patikimai sumažėjo (22 pav.).



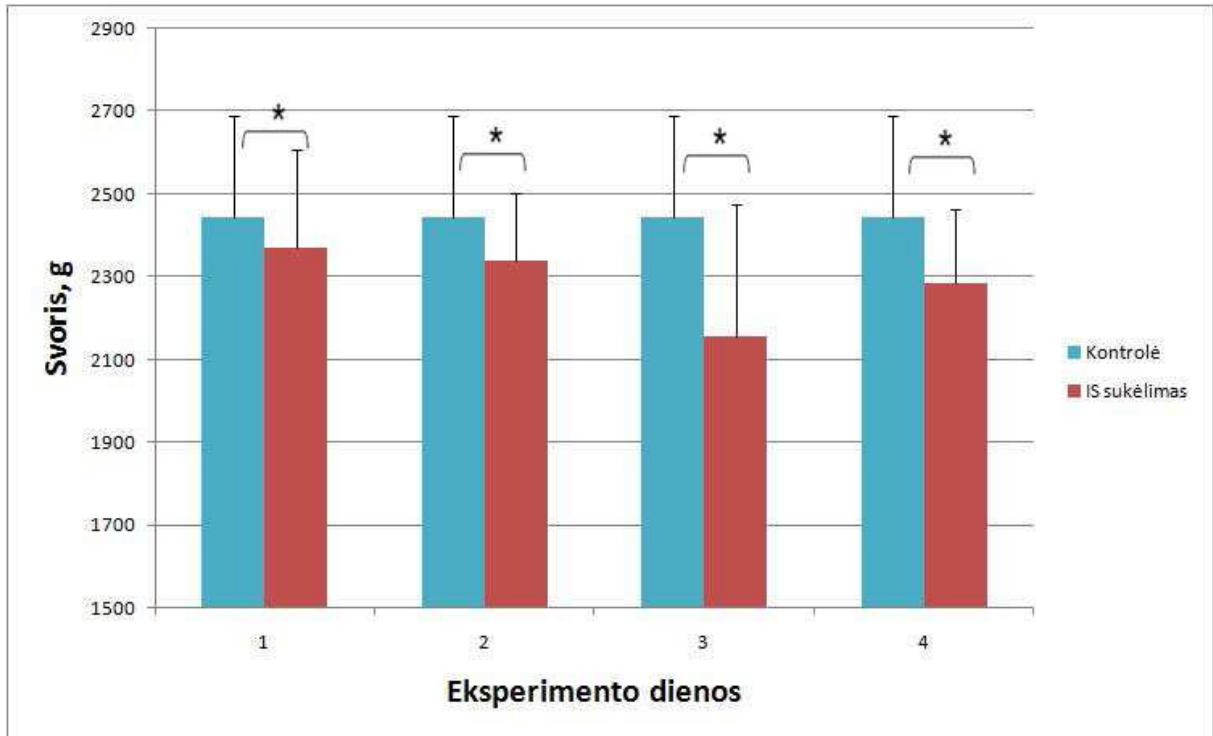
22 pav. K1 grupės svorio kitimas pradėjus susargdinimą (* p < 0.05).

K1 grupėje gydymas nebuvo taikomas, tačiau svoris pradėjo augti praėjus 8 savaitėm nuo IS sukėlimo (23 pav.), tačiau lyginant su savaite prieš gydymą, bei tarpusavy gydymo laikotarpiu statistiškai patikimų skirtumų nebuvo gauta.



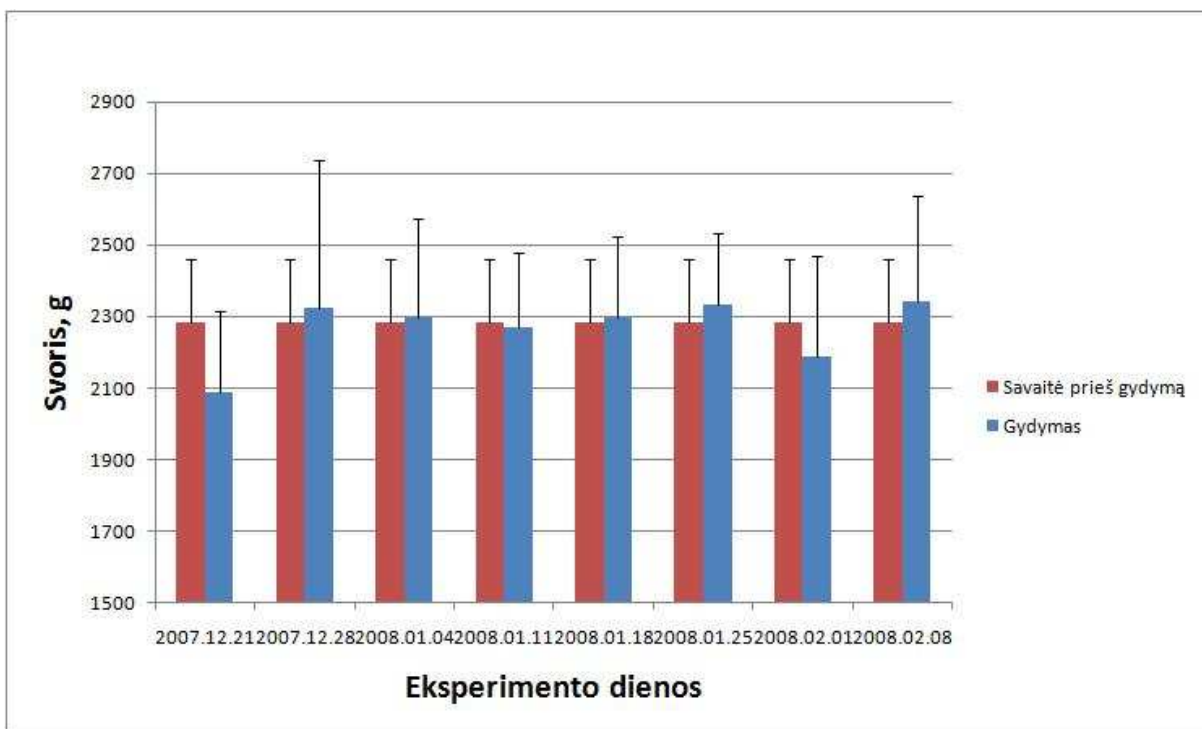
23 pav. K1 grupės svorio kitimas įvedus gydymą.

Atlikus K2 grupės analizę, rezultatai parodė, kad svoris nuo sukėlus IS per tris savaites statistiškai patikimai sumažėjo (24 pav.).



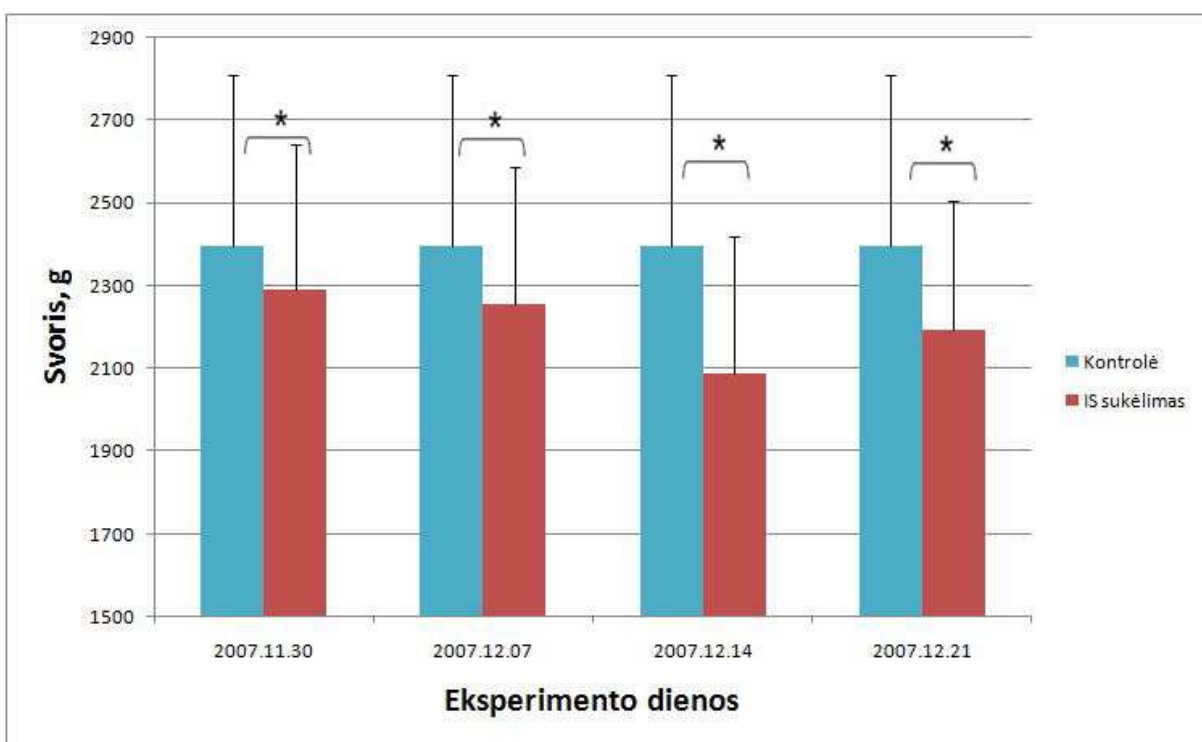
24 pav. K2 grupės svorio kitimas pradėjus susargdinimą (* $p < 0.05$).

K2 grupėje gydymas taip pat nebuvo taikomas, tačiau svoris pradėjo augti praėjus 8 savaitėm nuo IS sukėlimo. Lyginant su savaitė prieš gydymą, bei tarpusavy gydymo laikotarpiu statistiškai patikimų skirtumų nebuvo gauta (25 pav.).



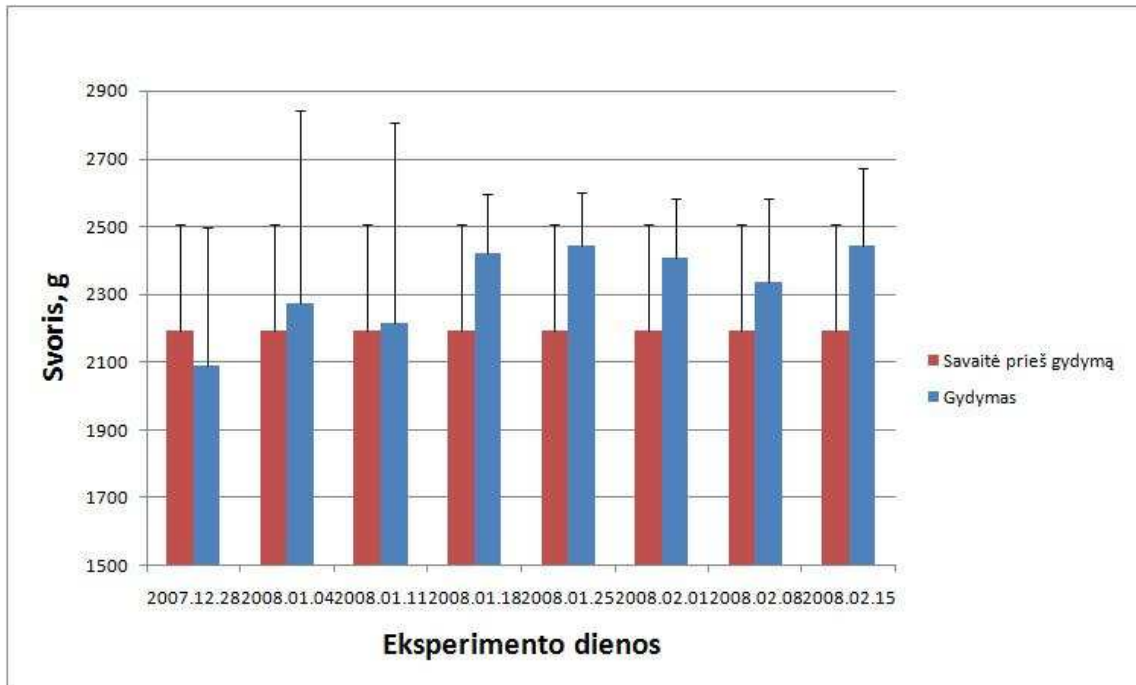
25 pav. K2 grupės svorio kitimas įvedus gydymą.

Kaip ir kitose grupėse, taip ir K4 grupėje pradėjus susargdinimą svoris per 3 savaites statistiškai patikimai sumažėjo (26 pav.).



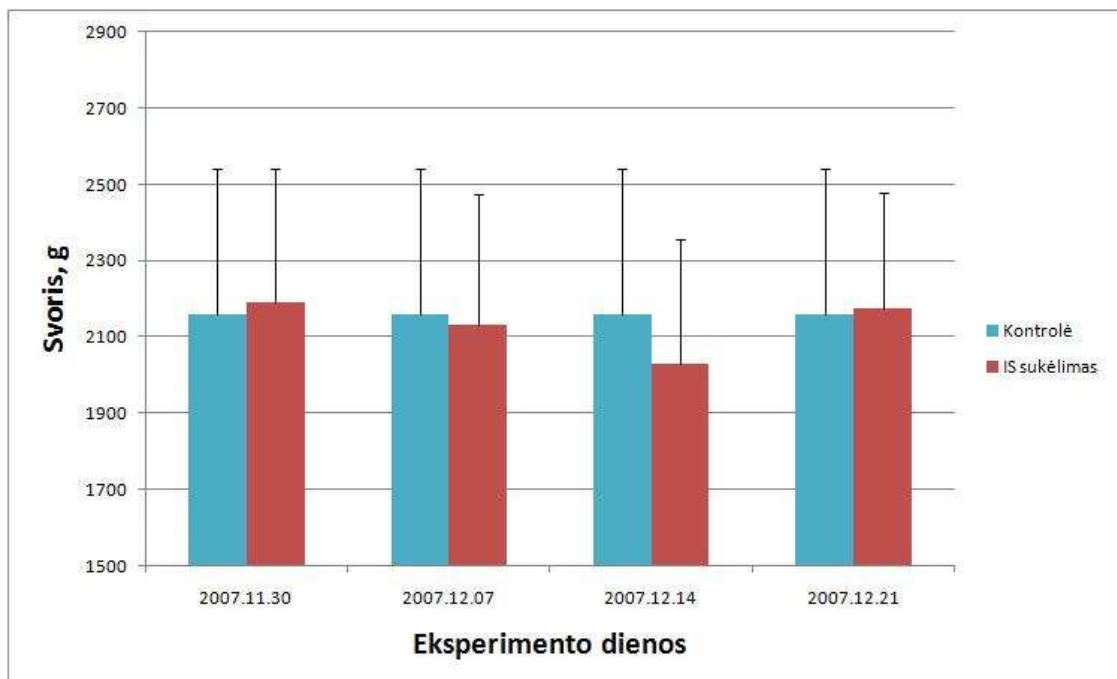
26 pav. K4 grupės svorio kitimas pradėjus susargdinimą (* p < 0.05).

K4 grupė buvo pradėta gydyti po 4 savaičių nuo susargdinimo. Palyginimui buvo paimta savaitė prieš gydymą su savaitėmis gydymo laikotarpiu. Kaip ir ankstesnėse grupėse, taip ir čia statistiškai patikimų skirtumų nėra (27 pav.).

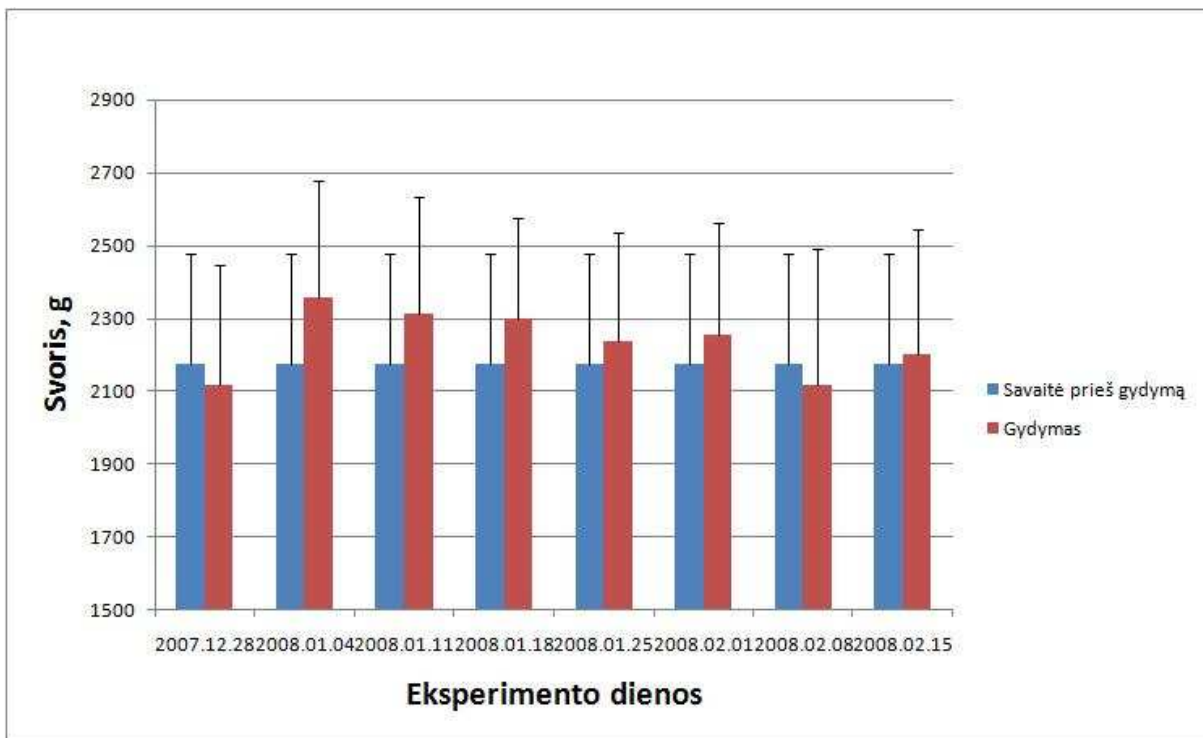


27 pav. K4 grupės svorio kitimas įvedus gydymą.

Skirtingai nei prieš tai išanalizuotos grupės K5 skiriasi tuo, kad svoris beveik nekinta. Kadangi tai kontrolinė grupė, jai nebuvo sukelta IS. Dėl to svoris patikimai nekinta per visą eksperimento laikotarpį (28 pav. Ir 29 pav.).



28 pav. K5 grupės svorio kitimas per visas eksperimento dienas.

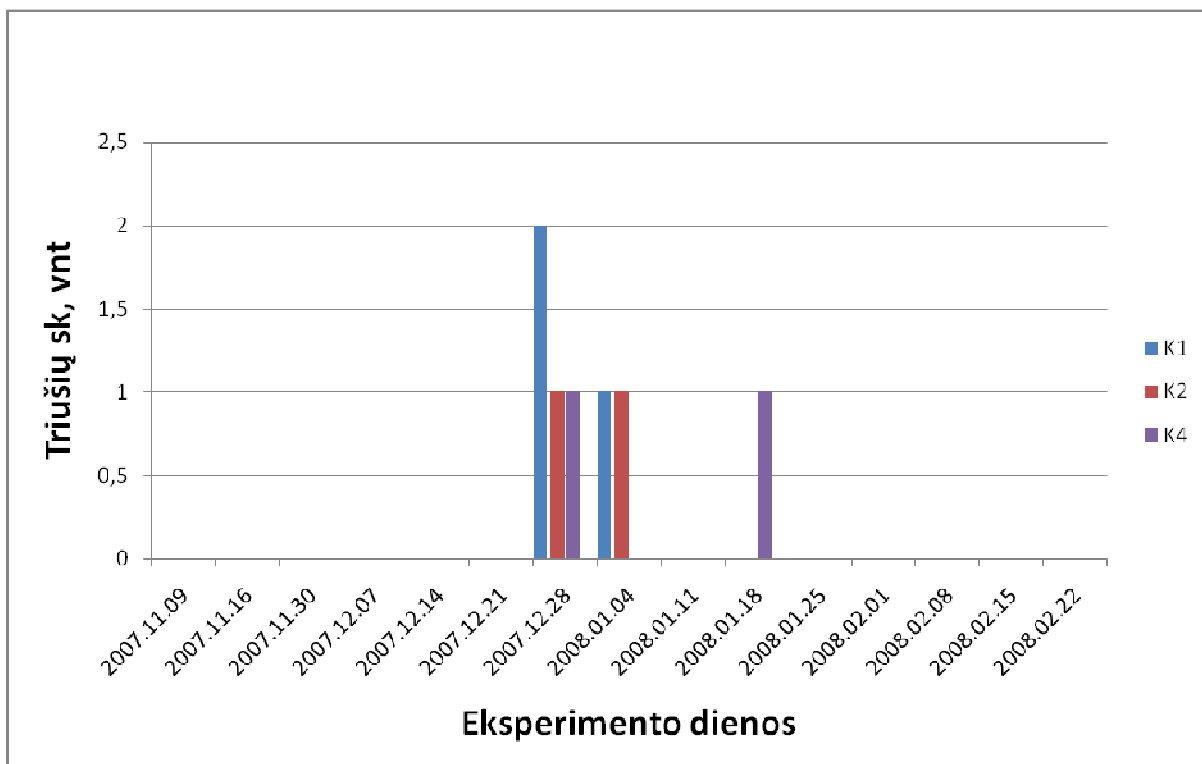


29 pav. K5 grupės svorio kitimas įvedus gydymą.

Taigi išanalizavus svorio kitimus grupėse gavome, kad K1 svoris po susargdinimo per tris savaites sumažėjo 11,8 % , K2 – 9 % , K4 – 8 % . K5 grupėje svoriai patikimai nekinta kadangi tai kontrolinė grupė.

3.3 Mirtingumo įvertinimas

Eksperimento metu taip pat buvo skaičiuojamas kritusių triušių skaičius. Iš viso per eksperimentą tirtose grupėse krito 7 triušiai (30 pav.). Kritimas prasidėjo pradėjus gydymą – 7 savaitę. 2009 12 28 nustatytas didžiausias kritusių triušių skaičius – 4. Per likusias 8 gydymo savaites krito likę 3 triušiai.



30 pav. Triušių mirtingumas per eksperimento dienas.

3.4 Atskirų individų analizė

Kadangi vidurkiai nevisada atspindi tendencijas, buvo analizuojamas tiriamų parametru kitimas kiekvienam triušiui atskirai. Buvo skaičiuojama H/M santykio tiesinė regresija. Rezultatai parodė, kad K1 grupėje susargdinus 3ijų triušių regresija buvo teigiama ir 3ijų neigiama. Pradėjus gydymą pas visus triušius K1 grupėje regresija buvo teigiama. K2 grupėje susargdinus 2jų triušių regresija buvo teigiama ir 4ijų neigiama. Pradėjus gydymą 2jų teigiama ir 2jų neigiama. K4 grupėje susargdinus 2jų teigiama ir 2jų neigiama. Pradėjus gydymą 3ijų teigiama, 2jų neigiama. K5 grupė kontrolinė, per visą eksperimento laikotarpį 3ijų triušius teigiama ir 1 neigiama.

Analizuojant svorio kitimą kiekvienam triušiui individualiai taip pat buvo skaičiuojama tiesinė regresija. Rezultatai parodė, kad K1, K2, K4 ir K5 grupėse sukėlus IS visų triušių regresija neigiama. Įvedus gydymą K4 grupėje iš 6 triušių pas 4 regresija buvo teigiama, pas likusius išliko neigiama, K5 grupėje regresija išliko neigiama. Nors K1 ir K2 gydymas nebuvo taikomas, čia regresija taip pat pakito po susargdinimo prėjus 4 savaitėms. K1 grupėje 2jų triušių regresija buvo teigiama ir 2jų neigiama. K2 grupėje 3ijų triušių regresija buvo

teigiama ir 1 neigiama. Palyginus tarp grupių, pastebėta, kad svoris greičiau auga K4 ir K5 grupėje, tai galima paaiškinti tuo, kad K1 ir K2 grupėse nebuvo įvedamas joks gydymas. Mažiausi svorio pakitimai buvo K5 grupėje, kadangi tai kontrolinė grupė.

4. Rezultatų aptarimas

Ekspertas Išsėtinės sklerozės sukėlimo ir terapijos elektrofiziologiniam įvertinimui truko 16 savaitių. Pirmos dvi savaitės – kontrolinės, trečia savaitė – susargdinimas, septinta savaitė – gydymo pradžia. Kadangi šis eksperimentas yra įvadinis, bandomasis, pasirinkta imtis nebuvo labai didelė. Eksperimentui buvo naudojami 32 triušiai, suskirstyti į skirtingas grupes, kurioms buvo taikomas skirtingas IS sukėlimo metodas bei gydymo būdas.

Eksperto metu buvo matuojama elektromiograma, registruojamas H refleksas ir M banga. Taip pat buvo stebimas svorio kitimas. Pagrindiniai uždaviniai buvo nustatyti H/M santykių kitimą tarp atskirų grupių, taip pat kiekvienam triušiui individualiai. Palyginti tarpusavyje bei kaip kinta sukėlus ligą bei įvedus gydymą. Taip pat nustatyti svorio kitimą grupėse bei individualiai pas kiekvieną. Kadangi pasitaikė mirties atvejų, buvo atlikta kiekybinė analizė mirtingumui įvertinti.

Literatūroje analizuojant H/M santykį, rezultatai parodė reikšmingus skirtumus tarp skirtingų lyčių (~33 %) (Lagarce F., Renaud P. et al., 2005). Kadangi šiame eksperimente triušiai nebuvo suskirstyti pagal lytį, dėl išsibarstymo nebuvo atsižvelgtas ir analizuotas H/M santykio skirtumas tarp lyčių.

Kadangi imtis buvo nedidelė, skirtumų patikimumui nustatyti buvo naudojamas Wilkoxsono suderintųjų porų testas (Wilcoxon's matched pairs test) mažoms imtims. Buvo nustatyta, kad K1, K2 bei K4 grupėse H/M santykis patikimai nekito per visą eksperimento laikotarpį. Taip pat lyginant tarpusavyje per susargdinimo bei gydymo laikotarpį gauti skirtumai patikimai nekito. K5 grupė buvo kontrolinė, todėl patikimų skirtumų taip pat nebuvo gauta.

Išanalizavus svorio kitimą K1, K2, K4 ir K5 grupėse buvo nustatyta, kad K1, K2 bei K4 grupėse lyginant pirmą savaitę su 3,4 ir 5 savaitėmis, kai buvo sukelta IS, skirtumai statistiškai patikimai mažėjo. Palyginus 4 savaitių svorio kitimą nuo susargdinimo pradžios, nustatyta, kad svoris patikimai mažėjo. Įvedus gydymą jau po savaitės buvo pastebėtas svorio augimas, tačiau statistinė analizė parodė, kad šis augimas patikimai nesiskiria nuo savaitės prieš gydymą. Kadangi K5 grupė kontrolinė, joje patikimų svorio kitimų nebuvo.

Atlikus individualią analizę, buvo skaičiuojama H/M santykių tiesinė regresija. Rezultatai parodė, kad K1 grupėje pas 3 triušius susargdinus regresija buvo neigiama ir pas 3 teigiama. Pradėjus gydymą pas visus triušius K1 grupėje regresija buvo teigiama. K2 grupėje susargdinus pas 4 triušius regresija buvo neigiama ir pas 2 teigiama. Pradėjus gydymą pas 2

neigiama ir pas 2 teigiama. K4 grupėje susargdinus pas 2 neigiama ir pas 2 teigiama. Pradėjus gydymą pas 2 neigiama, pas 3 teigiama. K5 grupė kontrolinė, per visą eksperimento laikotarpį pas 3 triušius teigiama ir pas 1 neigiama. Išanalizavus tokius rezultatus, priėjome išvadą, kad regresijos skaičiavimo rezultatai nieko reikšmingo neparodė. Taip yra todėl, kad kiekvieno triušio imuninė sistema skirtingai reaguoja į IS bei gydymą. Taip pat dėl skirtingų IS sukėlimo būdų (Yamada M., Zurbriggen A., Fujinami R.S. 1990).

Kadangi per eksperimentą pasitaikė mirčių atvejų, buvo atlikta kiekybinė mirtingumo analizė. Per visą eksperimentą krito 7 triučiai. Mirtingumo pikas prasidėjo pirmąją gydymo savaitę. Didžiausiais mirčių skaičius buvo K1 grupėje. Nei K1 nei K2 nebuvo taikomas gydymas, tačiau buvo sukelta IS. Šioje grupėje krito 3 triučiai. K4 grupei buvo sukelta IS ir taikomas gydymas. Krito 2 triučiai. K5 grupei buvo taikomas gydymas, tačiau šiai grupei nebuvo sukelta IS. Todėl manoma, kad mirčių priežastis yra sukėlimo ir gydymo kombinacija.

Išvados

1. K1 grupės triušiams suleidus 1,63 ml fiziologinio buferio + 1 ml ICF + 3 mg Mycobacterium tuberculosis ir taip sukėlus IS, analizuojant H/M santykius ligai progresuojant statistiškai patikimų skirtumų negauta.
2. K2 ir K4 triušiams suleidus 8 mg grubaus smegenų lizato + 4 mg MBP + 1 ml ICF + 3 g Mycobacterium tuberculosis ir taip sukėlus IS, analizuojant H/M santykius ligai progresuojant statistiškai patikimų skirtumų negauta.
3. K4 grupei taikant gydymą suleidžiant kaulų čiulpų ląsteles H/M santykiai statistiškai patikimai nekito.
4. K5 grupei taikant tik gydymą imunizuojant mielino baltymais aktyvuotais autoreaktyviais T – limfocitais H/M santykiai statistiškai patikimai nekito.
5. K1 grupės triušiams suleidus 1,63 ml fiziologinio buferio + 1 ml ICF + 3 mg Mycobacterium tuberculosis ir taip sukėlus IS svoris statistiškai patikimai sumažėjo.
6. K2 ir K4 triušiams suleidus 8 mg grubaus smegenų lizato + 4 mg MBP + 1 ml ICF + 3 g Mycobacterium tuberculosis ir taip sukėlus IS svoris statistiškai patikimai sumažėjo.
7. K4 grupei taikant gydymą suleidžiant kaulų čiulpų ląsteles svoris statistiškai patikimai nekito.
8. K5 grupei taikant tik gydymą imunizuojant mielino baltymais aktyvuotais autoreaktyviais T – limfocitais svoris statistiškai patikimai nekito.
9. Pradedant gydymą pirmą savaitę buvo mirtingumo pikas. Triušių kritimo priežastis – IS sukūlimo ir gydymo kombinacija.

Literatūros sąrašas

Alla L Zozulya and Heinz Wiendl (2008) „The role of regulatory T cells in multiple sclerosis“.

Budrys V. (2001) Išs_tin_ skleroz_ - viltys ir realyb_. Neurologijos seminarai 1-2:8-9.

Eilhard Mix, Jens Pahnke, and Saleh M. Ibrahim (© 2002), „Gene-Expression Profiling of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis“ *Neurochemical Research*, Vol. 27, No. 10, October 2002 pp. 1157–1163

I. Pericot, MD; E. Sánchez, MD; M. Comabella, MD; and X. Montalban, MD (2003) „New diagnostic criteria for multiple sclerosis“ *NEUROLOGY* 60 January

John H. Noseworthy , M.D., Claudia Lucchinetti , M.D., Moses Rodriguez , M.D., and Brian G. Weinshenker , M.D. (2000) „Multiple Sclerosis“ *The New England Journal of Medicine* September 28

Kandel R. Eric, Schwartz H. James, Jessel M. Thomas (2000) „Principles of neural science“ 4th edition.

Lagarce F., Renaud P., Faisant N., Nicolas G., Cailleux A., Richard J., Menei P., Benoit J.P. (2005) Baclofen-loaded microspheres: preparation and efficacy testing in new rabbit model. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics* 59:449-459.

Miller RH, Mi S.(2007) „Dissecting demyelination“.

M. Tintoré, MD; A. Rovira, MD; J. Rí’o, MD; C. Nos, MD; E. Grivé, MD; J. Sastre-Garriga, MD; (2003) „New diagnostic criteria for multiple sclerosis“ *NEUROLOGY* 60 January.

M.P. Pender (1996) „Recent advances in the understanding, dzagnosis and management of multiple sclerosis“ *Aust. NZJ Med*; 26

M. P. Pender (2000) „Multiple sclerosis“ *MJA* Vol 172 5 June.

Nikolaos Grigoriadis¹ and Georgios M Hadjigeorgiou (2006) „Virus-mediated autoimmunity in Multiple Sclerosis“ *Journal of Autoimmune Diseases*, 19 February.

Neil H Riordana, Thomas E Ichima, Wei-Ping Minb, Hao Wangb, Fabio Solanoc, Fabian Larac, Miguel Alfarod, Jeorge Paz Rodrigueze, Robert J Harmanf, Amit N Patelg; Michael P Murphyh, Roland R Leei, j, Boris Minev (2009) „Non-expanded adipose stromal vascular fraction cell therapy for multiple sclerosis“.

Petroška D. (2001) „Demielinizuojančių ligų patologija“ Neurologijos seminarai.

Riann M. Palmieri; Christopher D. Ingersoll; Mark A. Hoffman (2004) „The Hoffmann Reflex: Methodologic Considerations and Applications for Use in Sports Medicine and Athletic Training Research“ *Journal of Athletic Training* ;39(3):268–277

Robert m. Herndon, M.D. (2002), „Multiple Sclerosis Immunology, Pathology, and Pathophysiology.

Stuart RW, Racke MK (2002)“Targeting T cell costimulation in autoimmune disease“.

T. Jock Murray (2005) „Multiple Sclerosis: The History of a Disease“.

Waxman S.G. (2005) Multiple sclerosis as a neuronal disease. UK: Oxford.

Yamada M., Zurbriggen A., Fujinami R.S. (1990) Monoclonal antibody to Theiler's murine Encephalomyelitis virus defines a determinant on myelin and oligodendrocytes, and augments demyelination in experimental allergic encephalomyelitis. The Rockefeller University Press 171:1893-1907.

Internetiniai šaltiniai:

- i1. <http://is.santa.lt/default.asp?pusl=n05>
- i2. http://www.ninds.nih.gov/disorders/multiple_sclerosis/multiple_sclerosis.htm
- i3. <http://www.teleemg.com/new/jbr070.htm>
- i4. http://onprc.ohsu.edu/education/dspStudentsItem.cfm?doc_id=229
- i5. <http://www.ms-gateway.com/my-life-with-ms/introduction/what-is-ms-179.htm>
- i6. <http://www.mayoclinic.com/print/multiple-sclerosis/DS00188/DSECTION=all&METHOD=print>
- i7. <http://www.nationalmssociety.org/living-with-multiple-sclerosis/living-with-advanced-ms/progressive-disease/index.aspx>
- i8. <http://www.webmd.com/multiple-sclerosis/guide/multiple-sclerosis-causes>
- i9. <http://www.mult-sclerosis.org/DiagnosticCriteria.html>
- i10. http://www.medicinenet.com/multiple_sclerosis/page4.htm#6howis
- i11. http://hcd2.bupa.co.uk/fact_sheets/html/Multiple_sclerosis.html#5
- i12. <http://www.radiologyassistant.nl/en/4556dea65db62#a459bf2fc34950>
- i13. <http://health.nytimes.com/health/guides/disease/multiple-sclerosis/diagnosis.html>
- i14. <http://www.mult-sclerosis.org/experimentalautoimmuneencephalomyelitis.html>
- i15. <http://www.mdbiosciences.com/multiple-sclerosis-MS-EAE-In-vivo-Models-inflammation-service-cro-1.html>
- i16. <http://www.newscientist.com/article.ns?id=dn4356>
- i17. <http://www.is-centras.lt/>
- i18. <http://www.geocities.com/HotSprings/3468/edss.html#EDSS>
- i19. <http://www.mult-sclerosis.org/expandeddisabilitystatusscale.html>

i20. <http://www.ekmi.vu.lt/Klasteles/lasteles.htm>

i 21. http://www.timesonline.co.uk/tol/life_and_style/health/article5614644.ece

Vilniaus universitetas

Gamtos mokslų fakultetas

Biochemijos ir biofizikos katedra

Inga Starovoitova

Magistro darbas

Išsėtinės sklerozės sukėlimo ir terapijos elektrofiziologinis įvertinimas

Santrauka

Eksperimento tikslas – svorio kitimu bei elektrofiziologiniais parametrais įvertinti išsėtinės sklerozės sukėlimą bei gydymą. Tyrėme H/M santykio bei Burgundų triušių svorio kitimą esant skirtingiems eksperimento etapams – iki susargdinimo, po susargdinimo bei gydymo metu. Taip pat įvertinti mirtingumą per visą eksperimento laikotarpį. Eksperimentui, kuris truko 16 savaičių, buvo paimti 32 Burgundų linijos triušiai, suskirstyti į 5 grupes. Atlikus eksperimentą bei išanalizavus duomenis, gavome, kad H/M santykis per visas grupes patikimai nekinta. Susargdinus triušių svoris patikimai mažėjo, pradėjus gydymą patikimo svorio kitimo negauta. Eksperimento metu krito 7 triušių, 4 iš jų krito pirmą gydymo dieną.

Vilnius University

Faculty of Natural Sciences

Department of Biochemistry and Biophysics

INGA STAROVOITOVA

Master thesis

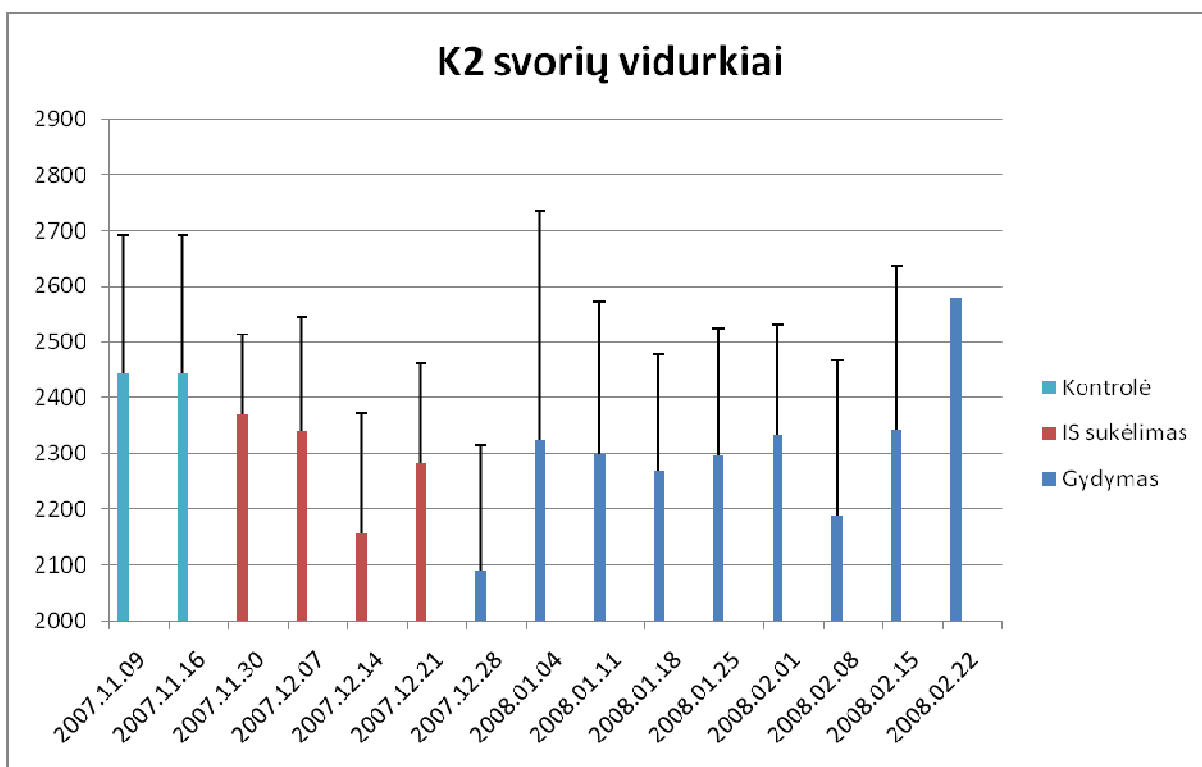
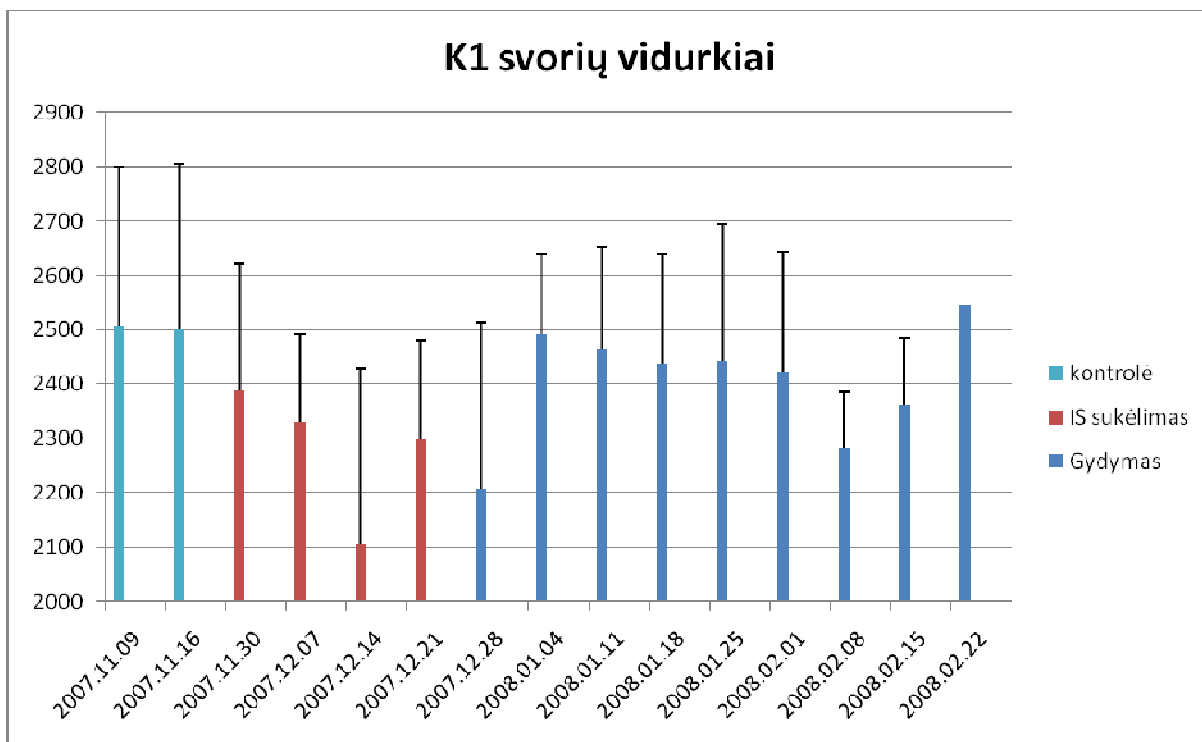
Electrophysiological Evaluation of Induction and Therapy of Multiple Sclerosis

Summary

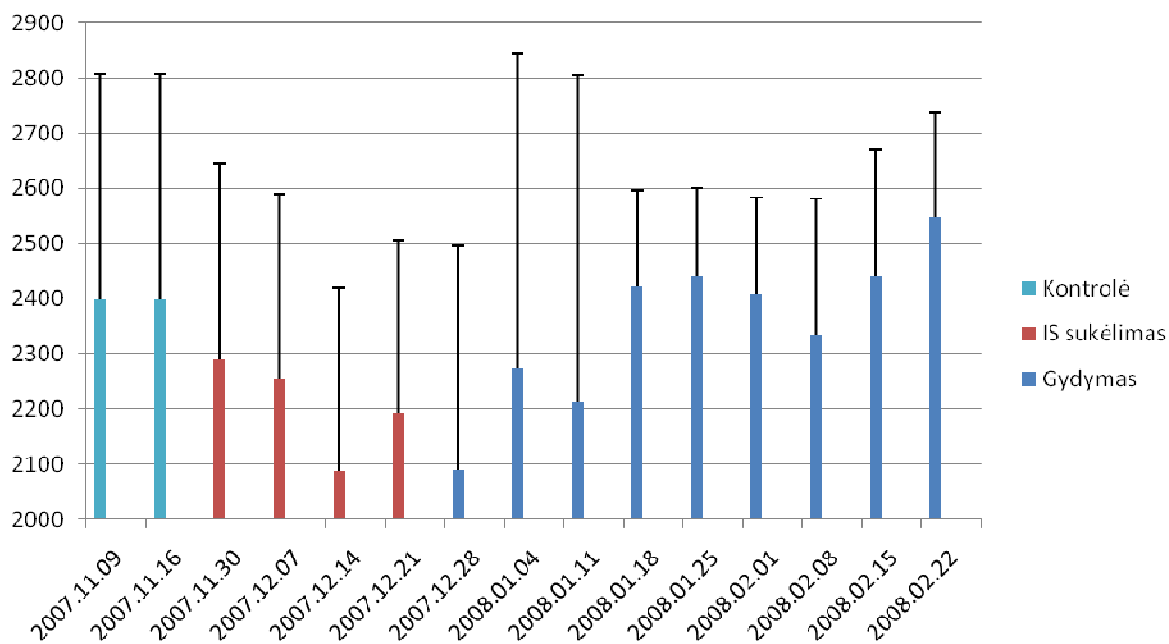
The aim of this study was to evaluate the induction and therapy of Multiple Sclerosis by means of body weight and electrophysiological parameters. The H/M ratio and weight were evaluated before induction, after, and during therapy of Multiple Sclerosis. The death rate was evaluated also. 32 burgundy rabbits, divided into 5 groups were used in experiment that lasted 16 weeks. We did not find significant changes in H/M ratio after induction of Multiple Sclerosis and due to treatment. However induction of Multiple Sclerosis significantly reduced the weights of animals. The maximal rate of death was at the first day of treatment

Priedai

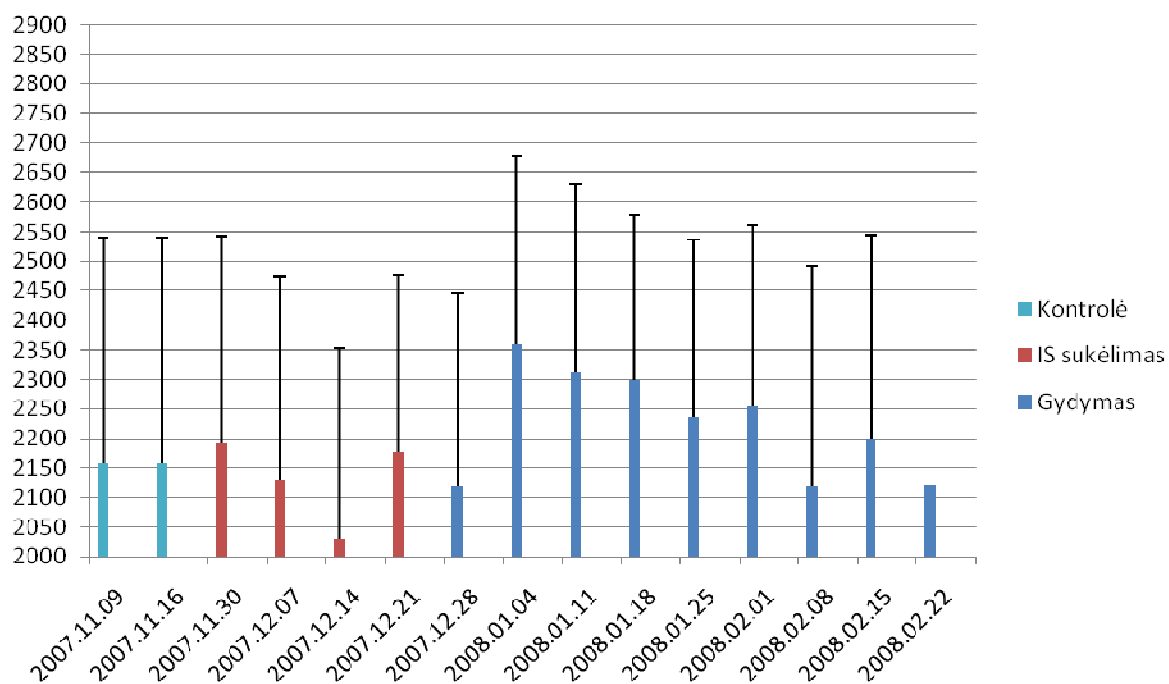
Svorių vidurkiai per eksperimento laikotarpį



K4 svorių vidurkliai



K5 svorių vidurkliai



Tiesinė regresija

